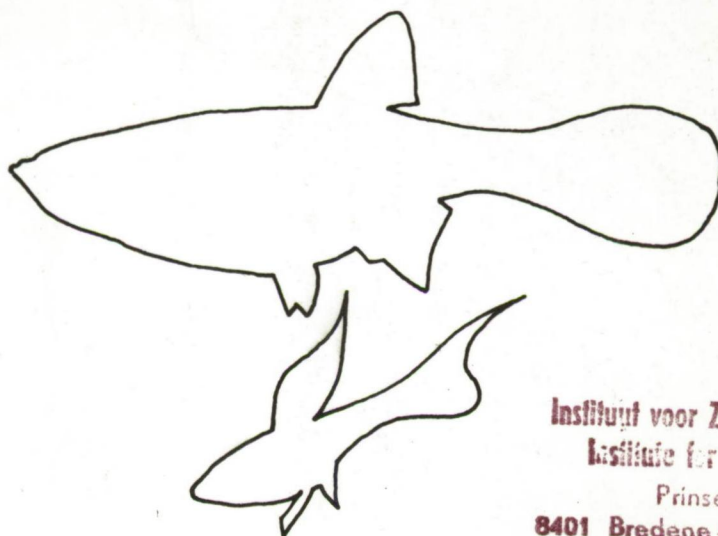


10.392
RIJKSUNIVERSITEIT GENT

FAKULTEIT der WETENSCHAPPEN

akademiejaar

1975 - 76



Instituut voor Zeewetenschappelijk onderzoek
Institute for Marine Scientific Research

Prinses Elisabethlaan 69

8401 Bredene - Belgium - Tel. 059 / 80 37 15

ONDERZOEK NAAR DE TOXICITEIT
VAN DRIE HERBICIDEN
OP HET AQUATISCH ECOSYSTEEM

Promotor

Prof. Dr. G. PERSOONE

Proefschrift voorgelegd tot het

bekomen van de graad van

DOCTOR in de WETENSCHAPPEN

door Christine CLAUS

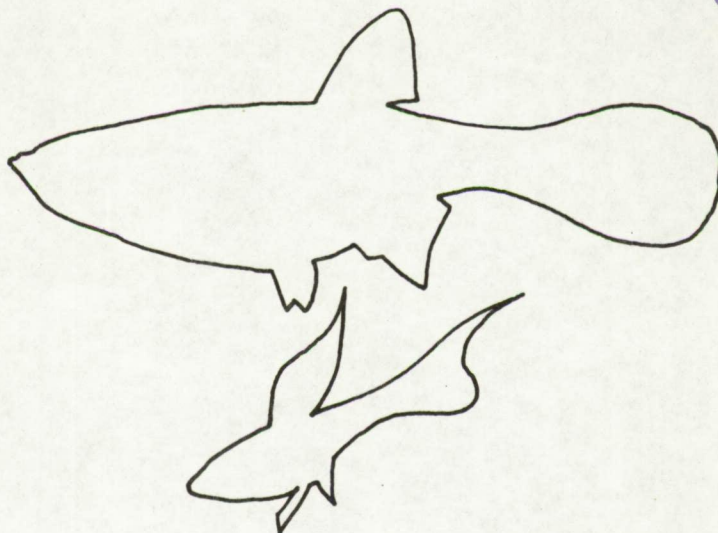
RIJKSUNIVERSITEIT GENT

FAKULTEIT der WETENSCHAPPEN

akademiejaar

1975 - 76

98234



**ONDERZOEK NAAR DE TOXICITEIT
VAN DRIE HERBICIDEN
OP HET AQUATISCH ECOSYSTEEM**

Promotor Prof. Dr. G. PERSOONE

**Proefschrift voorgelegd tot het
bekomen van de graad van
DOCTOR in de WETENSCHAPPEN**

door Christine CLAUS

DANKWOORD

Bij het beeindigen van dit onderzoek stel ik er prijs op mijn welgemeende dank te betuigen aan de talrijke personen die mij tijdens deze studie hebben bijgestaan.

Mijn dank gaat in de eerste plaats naar mijn promotor Prof. Dr. G. PERSOONE, directeur van het Laboratorium voor biologisch Onderzoek van Milieuverontreiniging, onder wiens leiding dit proefschrift tot stand kwam. Zijn interesse voor mijn onderzoek en zijn stimulans, die tot uiting kwamen in de talrijke discussies die wij hadden, waren onmisbare elementen bij de realisatie van dit onderzoek.

Zeer speciaal dank ik Prof. Dr. J. STRIJCKERS met wie detail-aspekten van het voorgestelde onderwerp werden besproken en Prof. Dr. J. HUBLE in wiens laboratorium dit onderzoek in de meest gunstige omstandigheden kon worden gestart.

Mijn oprechte dank gaat ook naar Prof. Dr. J. COSTLOW, directeur van het "Duke University Marine Laboratory" te Beaufort, North Carolina, USA, voor de mogelijkheid die ik kreeg om een deel van mijn doktoraatswerk in zijn laboratorium uit te voeren.

Ook betuig ik graag mijn dank aan Prof. Dr. H. STEYAERT, die voor ons de methode ter berekening van de regressievergelijkingen volledig uitgewerkt heeft en naar Prof. Dr. P. DINGENS die ons de rekentoestellen ter beschikking stelde voor het tekenen van de regressievergelijkingen.

Tevens dank ik Prof. Dr. G. DE LEYE op wiens personeel, meer bepaald de Heer F. PERSIJN, we mochten beroep doen om deze tekst in zijn uiteindelijke vorm te gieten.

Mijn bijzondere dank gaat ook naar Apotheker M. MARTENS voor zijn daadwerkelijke hulp en de raadgevingen in verband met het bepalen van paraquat-residus in weefsels.

Ook waardeer ik de informatie en de analytische produkten die ik mocht ontvangen van Ir. NIERINCK van ICI-Belgium en het research-team van Jealott's Hill Research Station van ICI in Bracknell, Engeland.

Ten slotte dank ik mijn kollega's voor hun hulp en advies en het technisch en administratief personeel van het laboratorium, in het bijzonder Mevrouw J. ALLEYN, op wiens steun ik steeds heb mogen rekenen.

Niet in het minst ben ik dank verschuldigd aan het Instituut tot Aanmoediging van het Wetenschappelijk Onderzoek in Nijverheid en Landbouw en het Nationaal Fonds voor Wetenschappelijk Onderzoek door wiens materiele hulp ik in staat werd gesteld tot het uitvoeren van deze studie.

Tot slot wil ik een heel bijzonder woord van dank richten aan mijn moeder, mijn echtgenoot en mijn familie, die mij voortdurend hebben bijgestaan en mij steeds op één of andere wijze behulpzaam zijn geweest.

I N H O U D S T A B E L

=====

1.	Inleiding en doelstelling	1.
2.	Effekt van chemikaliën op het aquatisch ekosys- teem	5.
3.	Gebruik van de onderzochte herbiciden in de landbouw en wettelijke voorschriften hierom- trent	10.
3.1.	Gebruik in de landbouw	10.
3.2.	Wettelijke voorschriften	11.
4.	Eigenschappen en kenmerken van de onderzochte herbiciden (literatuuroverzicht)	14.
4.1.	Paraquat en diquat	14.
4.1.1.	Fysische eigenschappen	14.
4.1.2.	Werking in planten	17.
4.1.3.	Dierlijke en menselijke pathologie.	22.
4.1.4.	Absorptie en exkretie	26.
4.1.5.	Biochemisch effect in dierlijke or- ganismen	29.
4.1.6.	Chemische afbraak in biodegradatie.	34.
4.2.	2,4-D (2,4-dichloorfenoxyzijnzuur)	40.
4.2.1.	Fysische eigenschappen	40.
4.2.2.	Werking in planten	41.
4.2.3.	Dierlijke pathologie	43.
4.2.4.	Absorptie en exkretie	44.
4.2.5.	Chemische afbraak en biodegradatie.	46.
5.	Bepaling van de toxiciteit van chemikaliën en aquatische organismen aan de hand van "bioas- says" of biotesten	52.
5.1.	Inleiding	52.
5.1.1.	Type bioassay	52.
5.1.2.	Keuze van het testorganisme	54.
5.1.3.	Testomstandigheden	56.
5.1.4.	Keuze van de testconcentraties en fysico-chemische aspecten van de bioassay	57.
5.1.5.	Kriterium	58.
5.1.6.	Verwerking van de resultaten	58.
5.1.7.	Interpretatie en extrapolatie	59.

5.2.	Toxiciteitsonderzoek op wieren	60.
5.2.1.	Gegevens over de gebruikte soorten en de technieken voor het onderhouden van de stocks	60.
5.2.2.	Bepaling van de groei van wierkulturen	61.
5.2.3.	Uittesten van geschikte voedingsmedia voor <u>Chlamydomonas reinhardi</u> en <u>Scenedesmus opoliensis</u>	64.
5.2.4.	Bioassay-techniek	68.
5.2.5.	Resultaten van de "Algal assays" met paraquat, diquat, 2,4-D en de twee uitvloeiers van paraquat . . .	71.
5.2.6.	Bespreking van de resultaten . . .	71.
5.3.	Toxiciteitsonderzoek op ciliaten	75.
5.3.1.	Inleiding	75.
5.3.2.	Gegevens over gebruikte soort . . .	77.
5.3.3.	Opsporen van geschikte cultuurmedia en voeding voor <u>Stylonychia mytilus</u>	77.
5.3.4.	Bioassay-techniek	82.
5.3.5.	Resultaten	83.
5.3.6.	Bespreking van de resultaten . . .	84.
5.4.	Toxiciteitsonderzoek op Crustacea	88.
5.4.1.	Branchiopoda : <u>Onychura</u> (<u>Daphnia magna</u> STRAUS en <u>Daphnia pulex</u> DE-GEER)	88.
5.4.1.1.	Gegevens over de proeforganismen en het onderhouden van de stockkulturen . . .	88.
5.4.1.2.	Isolatie van larven voor de bioassats .	89.
5.4.1.3.	Techniek van de bioassays	89.
5.4.1.4.	Resultaten van de akute bioassays . .	92.
5.4.1.5.	Bespreking van de resultaten	93.
5.4.1.6.	Resultaten van de chronische testen met <u>D. magna</u>	97.
5.4.1.7.	Bespreking van de resultaten	98.
5.4.2.	Branchiopoda : Anostraca (<u>Artemia salina</u>)	100.
5.4.2.1.	Inleiding	100.
5.4.2.2.	Hatching en separatie van de larven . .	101.
5.4.2.3.	Bioassay-techniek	101.
5.4.2.4.	Resultaten	102.
5.4.2.5.	Bespreking van de resultaten	102.
5.4.3.	Decapoda : Brachyura (<u>Rhithropanopeus harrisii</u> GOULD)	105.
5.4.3.1.	Inleiding	105.
5.4.3.2.	Gegevens over het proeforganisme . . .	106.
5.4.3.3.	Isolatie van de larven voor de bioassays	107.
5.4.3.4.	Bioassay-techniek	107.
5.4.3.5.	Resultaten	108.
5.4.3.6.	Bespreking van de resultaten	112.

5.5.	Toxiciteitsonderzoek op vissen	116.
5.5.1.	Gegevens over de gebruikte soorten en kweekomstandigheden	116.
5.5.1.1.	<u>Brachydanio rerio</u>	116.
5.5.1.2.	<u>Poecilia reticulata</u>	117.
5.5.2.	Bioassay-techniek	117.
5.5.2.1.	Proeven op adulte vissen (<u>B. rerio</u> en <u>P. reticulata</u>)	117.
5.5.2.2.	Proeven op eieren van <u>B. rerio</u>	118.
5.5.2.3.	Proeven op larven van <u>B. rerio</u>	118.
5.5.3.	Resultaten van de bioassays op adulte vissen	119.
5.5.4.	Bespreking van de resultaten	120.
5.5.5.	Resultaten van de bioassays op eie- ren en larven van <u>B. rerio</u>	126.
5.5.6.	Bespreking van de resultaten	128.
5.6.	Samenvatting van de resultaten omtrent de toxiciteit van de herbiciden paraquat, di- quat en 2,4-D en van de uitvloeiers lissap- ol NX en ethomeen S25 op de onderzochte vertegenwoordigers van het aquatisch eko- systeem	133.
5.6.1.	Paraquat	133.
5.6.2.	Diquat	138.
5.6.3.	2,4-D	139.
5.6.4.	De uitvloeiers : ethomeen S25 en lissapol NX	141.
6.	Invloed van tensio-actieve stoffen op de fyto- toxiciteit en de algemene toxiciteit van het herbicide paraquat	142.
6.1.	Inleiding	142.
6.2.	Eigenschappen van de detergents die een effekt kunnen hebben op de toxiciteit van paraquat	142.
6.3.	Opsporen van mogelijke interacties tussen paraquat en zijn uitvloeiers aan de hand van "faktoriële experimenten"	144.
6.3.1.	Metode	145.
6.3.2.	Materiaal	145.
6.3.3.	Resultaten en bespreking	146.
6.3.3.1.	<u>Scenedesmus opoliensis</u>	146.
6.3.3.2.	<u>Poecilia reticulata</u>	149.
6.3.4.	Besluiten	150.
6.4.	Vergelijking van de resultaten van de fak- torele experimenten met de resultaten van de gewone bioassays op wieren, crustaceen en vissen	151.

7.	Partitionering van herbiciden in een aquatisch ekosysteem	154.
7.1.	Inleiding	154.
7.2.	Adsorptie aan de sedimenten	156.
7.2.1.	Inleiding	156.
7.2.2.	Adsorptie van paraquat en diquat.	156.
7.2.3.	Adsorptie van 2,4-D	157.
7.3.	Adsorptie van paraquat en diquat aan wier- cellen <u>Scenedesmus opoliensis</u>	158.
7.3.1.	Inleiding	158.
7.3.2.	Materiaal en methode	159.
7.3.3.	Resultaten	161.
7.3.3.1.	Akkumulatie van diquat	162.
7.3.3.2.	Opmerking in verband met de kolorime- trische bepaling van diquat	163.
7.3.3.3.	Akkumulatie van paraquat	163.
7.3.4.	Bespreking van de resultaten	164.
7.3.5.	Besluiten	166.
7.4.	Akkumulatie van paraquat en diquat in vis- sen (<u>Brachydanio rerio</u> en <u>Poecilia reticu- lata</u>)	166.
7.4.1.	Methode	166.
7.4.2.	Materiaal	169.
7.4.3.	Resultaten	170.
7.4.4.	Akkumulatie van paraquat in <u>B. re- rio</u>	171.
7.4.5.	Akkumulatie van paraquat in <u>P. re- ticulata</u>	173.
7.4.6.	Akkumulatie van diquat in <u>P. reti- culata</u>	174.
7.4.7.	Samenvatting	175.
8.	Samenvatting van de resultaten en algemene bespreking.	177.
9.	Algemene besluiten	191.
10.	Samenvatting	196.

Bibliografie

LIJST DER FIGUREN

- 1) Structuur van het paraquat-kation en zijn gereduceerde vrije radikaalvorm.
- 2) Structuur van het diquat-kation.
- 3) Omzetting van het paraquat-ion tot het vrij radikaal en auto-oxidatie van dit radikaal met vorming van H_2O_2 of $OH\cdot$.
- 4) Vereenvoudigd model van de fotosynthese met aanduiding van de inwerking van verschillende herbiciden op de fotosynthese.
- 5) Voorgesteld werkingsmechanisme van paraquat in dierlijke organismen.
- 6) Concentratie van paraquat in plasma en weefsel van ratten na een intraveneuze toediening van 20 mg paraquat dichloride /kg lichaamsgewicht.
 - A. Gemiddelde waarden voor 4-5 ratten \pm standaarddeviatie.
 - B. Gemiddelde waarden voor 2 ratten.
- 7) Reduktie en reoxidatie van paraquat.
- 8) Vicious cirkel tussen een zuurstof- of paraquat-vergiftiging en een deficiëntie van het longtensioactief.
- 9) Fotodegradatieprodukten van paraquat.
- 10) Vooropgesteld afbraakproces van paraquat onder invloed van ultraviolet licht.
- 11) Vooropgesteld fotodegradatieproces van diquat.
- 12) Vooropgesteld bacterieel afbraakproces van paraquat.
- 13) Metabolieten van paraquat teruggevonden in mammalia.
- 14) Metabolieten van diquat teruggevonden in kippen.
- 15) Structuurformule van 2,4-D (vrij zuur).
- 16) Algemene structuurformule van 2,4-D-aminozuurconjugaten.
- 17) Vooropgesteld afbraakmechanisme van 2,4-D in hogere planten.
- 18) Twee gehydroxyleerde afbraakprodukten van 2,4-D uit het callus-weefsel van soya.
- 19) Gehydroxyleerd afbraakprodukt van 2,4-D uit het callus-weefsel van koren.
- 20) Vooropgesteld mechanisme voor de biologische hydroxylatie van de aromatische ring van 2,4-D.
- 21) Gehydroxyleerd afbraakprodukt van 2,4-D uit het groenwier Sce-nedesmus quadricauda.
- 22) Vooropgesteld fotodegradatieproces van 2,4-D in water.
- 23) Schema der wierkweekmethode.
- 24) Experimentele groeikurve van Cyclotella cryptica, uitgezet op semilogaritmisch papier. AA' = exponentiële groei van de wierpopulatie.
- 25) Opstelling voor bioassays met mikroalgen. Detail van een kweekbuis.
- 26) Experimentele groeikurven van Chlamydomonas reinhardi in verschillende voedingsmedia. 1ste reeks proeven.
- 27) Experimentele groeikurven van Chlamydomonas reinhardi in verschillende voedingsmedia. 2de reeks proeven.
- 28) Experimentele groeikurven van Chlamydomonas reinhardi in verschillende concentraties PMU, PZU en lissapol NX.
- 29) Experimentele groeikurven van Chlamydomonas reinhardi in verschillende concentraties ethomeen S25, diquat en 2,4-D.

- 30) Experimentele groeikurven van Scenedesmus opoliensis in verschillende concentraties PMU, PZU en lissapol NX.
- 31) Experimentele groeikurven van Scenedesmus opoliensis in verschillende concentraties van ethomeen S25, diquat en 2,4-D.
- 32) "Triplicate isolation culture technique" van CURDS & VANDYKE.
- 32)bis "Triplicate isolation culture technique": frekwentie en aantal verversingen.
- 33) Populatiegroei van Stylonychia mytilus met verschillende concentraties van Chlamydomonas reinhardi..
- 34) Populatiegroei van Stylonychia mytilus in verschillende media.
- 35) Populatiegroei van Stylonychia mytilus in zacht water met verschillende concentraties bodemextract.
- 36) Populatiegroei van Stylonychia mytilus met verschillende 'inerte' voedselbronnen.
- 37) Bioassay met 2,4-D met Stylonychia mytilus gevoed enerzijds met 0.02 g/l gedroogde bakkersgist en anderzijds met 0.08 g/l gedroogde Scenedesmus-cellen:
Bepaling van de ED₅₀-waarden met betrouwbaarheidsinterval volgens LITCHFIELD & WILCOXON (1948).
- 38) Kweekbuis voor crustaceën-larven.
- 39) Dosis-effekt-kurve voor de toxiciteitsproeven met 2,4-D op Daphnia magna.
- 40) Larvale stadia van de krab Rhithropanopeus harrisii Gould.
- 41) Effect van PMU, PZU, lissapol NX, ethomeen S25, diquat en 2,4-D op de duur van de larvale ontwikkeling van R.harrisii.
- 42) "Breedind-trap" voor vissen.
- 43) Kontakthoek en kontaktoppervlak van een druppel spuitvloeistof.
- 44) Procentuële inhibitie-isopleten van Scenedesmus opoliensis i.f.v. de concentratie paraquat en het percent toegevoegde uitvloeiers.
De uitvloeiers ethomeen S25 en lissapol NX werden in drie verhoudingen toegediend. A: 1:9; B: 1:1 en C: 9:1. In D worden de 50 % inhibitie-isopleten van de drie verhoudingen vergeleken.
- 45) Procentuële mortaliteit-isopleten van Poecilia reticulata i.f.v. de koncontrayie paraquat en het percent toegevoegde uitvloeiers.
De uitvloeiers ethomeen S25 en lissapol NX werden in drie verhoudingen toegediend. A: 1:9; B: 1:1 en C: 9:1. In D worden de 50 % mortaliteit-isopleten van de drie verhoudingen vergeleken.
- 45)bis Partitionering van een polluans in een aquatisch ecosysteem.
- 46) Ijkkurven voor paraquat (100.0 % zuiver). A. 1 - 10 ppm
B. 0.25 - 1 ppm.
- 47) Ijkkurven voor diquat (100.0 % zuiver) A. 1 - 10 ppm
B. 0.25 - 1 ppm.
- 48) Akkumulatie van diquat in/aan Scenedesmus opoliensis-cellen
A. in het licht. B. in het donker.
Koncentratie diquat in het blankomedium en in het medium met 0.5×10^6 , 5×10^6 en 10×10^6 wiercellen/ml i.f.v. de tijd.

- 49) Akkumulatie van diquat in/aan Scenedesmus opoliensis-cellen. A. in het licht. B. in het donker.
Residu diquat in 0.5×10^6 , 5×10^6 en 10×10^6 wiercellen/ml i.f.v. de tijd.
- 50) Adsorptiespektrum van niet gereduceerd diquat.
- 51) Adsorptiespektrum van niet gereduceerd diquat samen met een onbekende gele komponent.
- 52) Akkumulatie van paraquat in/aan Scenedesmus opoliensis-cellen. A. in het licht. B. in het donker.
Residu paraquat in 5×10^6 en 10×10^6 wiercellen/ml i.f.v. de tijd.
- 53) Rendement van de ionenuitwisselaar en van de elutie met 6 M HCl. A. van paraquat. B. van diquat.
- 54) Akkumulatie van paraquat in Brachydanio rerio:
residu (ug paraquat-ion/g natgewicht vis) i.f.v. de test-koncentratie.
- 55) Paraquat-koncentratie in het bloed van katten na een orale dosis paraquat van 62.5 mg/kg. Het effect van drie verschillende behandelingen op de paraquatkoncentratie in het bloed.
- 56) Akkumulatie van paraquat in Poecilia reticulata:
residu (ug paraquat-ion/g natgewicht vis) i.f.v. de test-koncentratie.
- 57) Akkumulatie van diquat in Poecilia reticulata:
residu (ug diquat-ion/g natgewicht vis) i.f.v. de test-koncentratie.

LIJST DER TABELLEN

- 1) Toxiciteit van paraquat bij orale toediening aan verschillende diening aan verschillende diersoorten.
- 2) Verhouding tussen de concentratie paraquat en diquat opgehoopt in ratweefsel.
- 3) Percentages paraquat en zijn metaboliëten teruggevonden in de urine van koeien.
- 4) Percentages paraquat en zijn metaboliëten teruggevonden in koe-melk.
- 5) Lijst van de meest gebruikte 2,4-D-derivaten.
- 6) Residues (mg/kg of mg/l) van DMA-¹⁴C-2,4-D in de weefsels van Ictalurus punctatus ("channel catfish"), Micropterus salmoides (forellenbaars) en Lepomis macrochirus ("bluegill") en in het water en de sedimenten van vijvers na een behandeling met 2.0 mg/l 2,4-D.
- 7) Formule van de gebruikte artificiele media.
- 8) Voedingsmedia voor wierkweek.
- 9) Samenstelling van de media in de 1ste en 2de reeks proeven met Chlamydomonas reinhardi.
- 10) ED₅₀-waarden van Chlamydomonas reinhardi en Scenedesmus opolien-sis voor de produkten PMU, PZU, lissapol NX, elkomeen §25, diquat en 2,4-D.
- 11) ED₅₀-waarden van 4 mariene eencellige wiersoorten voor 2,4-D, paraquat en diquat.
- 12) "Difference factor" tussen de resultaten bekomen met Chlamydomonas reinhardi en Scenedesmus opoliensis.
- 13) Bioassays met 2,4-D met Stylonychia mytilus gevoed met 0.02 g/l gedroogde bakkersgist. :
Absolute aantallen in de kuvetten in functie van de concentratie 2,4-D gedurende de 6 opeenvolgende proeven.
- 14) Bioassay met 2,4-D met Stylonychia mytilus gevoed met 0.02 g/l gedroogde bakkersgist:
Aantallen na 72 uur uitgedrukt in aantal generaties.
- 15) Bioassay met 2,4-D met Stylonychia mytilus gevoed met 0.02 g/l gedroogde bakkersgist :
Per proef is de hoogste waarde van het aantal generaties na 72 uur uitgedrukt als % t.o.v. de hoogste waarde van de respektievelijke blanco van die % is het gemiddelde uitgerekend, de variantie standaarddeviatie en de variatiekoëfficiënt.
- 16) Bioassay met 2,4-D met Stylonychia mytilus gevoed met 0.08 g/l gedroogde Scenedesmus-cellen
Absolute aantallen na 72 uur in de kuvetten in functie van de concentratie 2,4-D gedurende de 5 opeenvolgende proeven.
- 17) Bioassay met 2,4-D gevoed met 0.08 g/l Scenedesmus-poeder :
Aantallen na 72 uur uitgedrukt in aantal generaties.
- 18) Bioassay met 2,4-D met Stylonychia mytilus gevoed met 0.08 g/l Scenedesmus-poeder
Per proef is de hoogste waarde van het aantal generaties na 72 uur uitgedrukt als % t.o.v. de hoogste waarde van de respektievelijke blanco van die % is het gemiddelde uitgerekend, de variantie standaarddeviatie en de variatiekoëfficiënt.

- 19) Resultaten van de akute bioassays met Daphnia magna-larven in verschillende testomstandigheden.
- 20) TL₅₀-waarden met D.magna en D.pulex adulten en larven na 24 en 48 uur.
- 21) Vergelijking tussen de resultaten van de akute testen met Daphnia en literatuurgegevens.
- 22) Chronische test met 2,4-D op Daphnia magna. Zonder luchtdoorborreling.
A+: kumulatief aantal aantal dode adulten
L : Aantal larven per waarneming.
- 23) Chronische test met 2,4-D op Daphnia magna. Met luchtdoorborreling.
- 24) Chronische test met 2,4-D op Daphnia magna. Met luchtdoorborreling.
- 25) Chronische test met 2,4-D op Daphnia magna. Inhibitie van de reproductie.
- 26) Resultaten van de akute bioassays met Artemia salina-larven in verschillende testomstandigheden.
- 27) Verhoudingen TL₅₀ na 24 uur en na 48 uur met A.salina-larven.
- 28) Procent mortaliteit t.o.v. de blanco, gedurende de totale larvale ontwikkeling van Rhithropanopeus harrisii.
- 29) Procentuele mortaliteit in de opeenvolgende larvale stadia (4 zoea-larven, 1 megalopa) van R.harrisii.
- 30) Procent larven t.o.v. blanco dat zich ontwikkelt van hatch (H) tot megalopa (M) van hatch tot 1ste krab (C) en van megalopa tot 1ste krab.
- 31) Aantal dagen vertraging van de larvale ontwikkeling van R. harrisii t.o.v. de blanco.
- 32) TL₅₀²⁴⁻⁹⁶-waarden met adulte Brachydanio rerio en Poecilia reticulata.
- 33) Vergelijking met literatuurgegevens i.v.m. de TL₅₀-waarden van diquat en paraquat met vissen.
- 34) TL₅₀⁶⁻⁹⁶-waarden van 4 gramoxone-formuleringen en twee uitvloeiers met Salmo trutta.
- 35) TL₅₀²⁴⁻⁹⁶-waarden van vijf 2,4-D-formuleringen met verschillende vissoorten.
- 36) TL₅₀²⁴⁻⁹⁶-waarden met eieren en larven van Brachydanio rerio.
- 37) Rangorde in toxiciteit (van hoog naar laag) voor B.rerio-eieren en larven.
- 38) Samenvattende tabel met de TL₅₀-waarden van PMU, PZU, diquat, 2,4-D, lissapolNX en ethomeen^{S25} met alle testorganismen. (alleen de TL₅₀-waarden met de langste testduur werden opgenomen)
- 39) Residus (in ppm) in het water en de sedimenten van vijvers behandeld met 2,4-D, paraquat of diquat. De concentratie in het water is bij de start respectievelijk 1.33, 1.14 en 0.62 ppm.
- 40) Akkumulatie van paraquat en diquat in de vissen Brachydanio rerio en Poecilia reticulata.

1. INLEIDING EN DOELSTELLING

Waterplanten komen in ons land in alle types van oppervlaktewater voor en omvatten alle phyla van het plantenrijk. De opbouw van de gemeenschappen verschilt van plaats tot plaats, afhankelijk van de fysische eigenschappen en de chemische samenstelling van het water alsmede van de opbouw van het profiel.

Zonder menselijke ingreep kunnen waterplanten in talrijke gevallen niet alleen het gehele oppervlak, maar ook praktisch het totale volume van een watergang bezetten met als gevolg dat de waterbewegingen worden gestagneerd. De mening dat eutrofiëring de groeisnelheid van een aantal als hinderlijk gekwalificeerde soorten vergroot (Elodea, Ceratophyllum, Myriophyllum, Potamogeton en vooral draadwieren), waardoor hun massaliteit sneller problemen gaat opleveren wordt thans door meer en meer praktijkgevallen bewezen (VAN ZON en ZONDERWIJK, 1973).

Het met tussenpozen onderbreken van de verlanding door uitbreiding van de makrofytische vegetatie kan in de praktijk op twee principieel verschillende manieren gebeuren, nl. door het plantenmateriaal met handkracht of mechanisch te verwijderen, of door het aanwezig plantenmateriaal met herbiciden te doden.

Wanneer wij financiële overwegingen buiten beschouwing laten, is de mechanische methode ongetwijfeld de meest geschikte voor het in stand houden van alle traditionele waterfuncties. Zij is echter niet van toepassing in sterk geëutrofiëerde stilstaande waters, omdat het schonen van de sloten snel gevolgd wordt door een volledig andere begroeiing door draadalgen. Deze krijgen in de warme zomermaanden door wegnahme van de concurrentie, en bij een fosfaatgehalte boven 0.05 mg/l plotseling de kans om massaal te gaan ontwikkelen en hebben in het algemeen een negatieve invloed op de waterfuncties (VAN ZON, 1973). Daarbij zijn draadwieren zelf zeer moeilijk mechanisch te verwijderen.

Naar aanleiding van het succes van herbiciden bij de bestrijding van het onkruid in diverse teelten en tevens door

toenemend gebrek aan en de duurte van arbeidskrachten voor klassiek onderhoud van watergangen werd de verworven ervaring met herbiciden op het land ook op het wateronkruidprobleem uitgetest.

Aanvankelijk werd alleen de oevervegetatie bestreden. De toepassing van herbiciden in open water kwam pas rond 1960. Het werd van begin af duidelijk dat bij het onderzoek over de toepassingsmogelijkheden van reeds bekende herbiciden, niet alleen het direkte effect op de planten diende gevolgd te worden, maar dat ook informatie moest worden verkregen over de gevolgen voor de gehele biocoenose. Dit gold zowel voor het direkte effect van het herbicide als voor het effect van het massaal afsterven van bepaalde plantensoorten ten gevolge van de behandeling. Deze plantenresten worden immers niet, zoals bij de mechanische reiniging het geval is, uit het water verwijderd.

Kwoteren wij VAN ZON (1973) : "het toepassen in water waar geen hypertrofiëring plaats vindt geldt nog in sterkere mate voor het gebruik van vele herbiciden, omdat deze zelf een trofiërend effect hebben : de planten worden in situ gedood zodat geen voedingsstoffen aan het water worden onttrokken. Van niet-persistente, snelwerkende herbiciden als paraquat en diquat is dan ook bekend dat zij in weinig stromend water een draadalgenprobleem kunnen doen ontstaan.

Herbiciden kunnen bovendien geruime tijd zuurstofgebrek veroorzaken doordat een aantal zuurstofverbruikende processen achter elkaar optreden : In de eerste instantie gaat de respiratie van de autotrofe organismen nog enige tijd door, terwijl de fotosynthese is gestopt en vervolgens vereist de microbiële afbraak van het afstervende plankton en plantenmateriaal in principe evenveel zuurstof als er tijdens de opbouw is vrijgekomen, maar dan in een veel kortere tijd. Dit zuurstofgebrek heeft een aantal direkte gevolgen voor het aquatische leven, maar ook indirecte : mobilisatie van aan het slib gebonden zware metalen is mogelijk, terwijl in het soms volledig anaerobe milieu reducerende bacteriën ammoniak en zwavelwaterstof kunnen gaan produceren".

Een derde bestrijdingsmethode, waardoor men een continue in plaats van diskontinue schoning van de waterlopen bekomt,

is de biologische bestrijding van de vegetatie met afoogsting van de produktie. In Nederland behaalde men reeds goede resultaten met de herbivore vis Ctenopharyngodon idellus of Chinese graskarper (VAN ZON, 1974). Het probleem bij de biologische bestrijding, die meestal vrij selektief is, is dat noch de vegetatie die niet wordt begraasd noch de biologische bestrijder zelf een plaag mag worden (HAIRSTON et al., 1960 ; WILSON, 1964). De proefnemingen met de graskarper zijn in die optiek zeer positief omdat, door een berekening van de gunstige bezetting zodat van alle plantensoorten alleen de aangroei wordt gegeten, en omdat door te lage zomertemperaturen de voortplanting van de vis wordt verhinderd, de kans op plaagvorming minimaal is (VAN ZON, 1974).

Een keuze van één of andere bestrijdingstechniek dient afhankelijk te worden gesteld van de functies die het betreffend water heeft te vervullen. Men kan hierin onderscheiden :

- agrarische functie
- industriële functie
- scheepvaart functie
- recreatieve functie
- natuurlijk biologische functie.

Een bestrijdingsmiddel dient dus om de één of andere functie te verbeteren. Voor de eerste drie functies is het duidelijk dat een chemisch bestrijdingsmiddel tot nu toe de grootste voldoening geeft. Een ideaal middel voor deze doeleinden is een goedkope, hoog-fytotoxische persistente allesdoder.

Wat betreft de agrarische functie dient opgemerkt dat we de klemtoon legden op de drainerende functie van de sloten. Indien het slootwater wordt aangewend voor besproeiing van de kultuurgewassen of als drinkwater voor vee, kan deze functie beter samen met de twee laatste functies beschouwd worden waarbij een chemische bestrijder nevenwerkingen kan vertonen die tot een minimum moeten herleid worden. In deze optiek is dan een ideaal bestrijdingsmiddel een niet toxisch herbicide dat niet persistent is, niet akkumuleert en dat het ecosysteem biologisch, chemisch en fysisch slechts kortdurend, maar in elk geval reversibel verandert.

In het geval van een dergelijk doelbewust toedienen van een bepaalde dosis 'toxikant' (want 'toxisch' is een herbicide alvast voor één plantensoort), moet men, als voor de studie van de invloed van chemikaliën op het aquatische ecosysteem, vier verschillende aspecten belichten : de toxiciteit van het produkt, de persistentie, de accumulatie en zijn beïnvloeding van het biotoop.

De bedoeling van dit doktoraatswerk bestond erin aan de hand van een experimenteel biologisch onderzoek de invloed op het aquatisch ecosysteem na te gaan van de drie herbiciden die het meest aangewend worden voor bestrijding van water- en oevervegetatie : paraquat, diquat en 2,4-D.

Hiervoor werd de rechtstreekse toxiciteit van deze 3 produkten alsook de accumulatie in wieren en vissen van twee onder hen (paraquat en diquat) in het laboratorium bestudeerd. De aldus ingewonnen informatie werd aangevuld en vergeleken met gegevens uit de literatuur teneinde de huidige wettelijke voorschriften in verband met de toepassing van deze herbiciden in oppervlaktewater op hun waarde te schatten.

Aangezien in de praktijk ook formuleringen van paraquat worden gebruikt waarin detergenten voorkomen hebben wij tevens gepoogd na te gaan welke invloed de detergenten lissapol NX en ethomeen S25 op de toxiciteit van paraquat hebben.

2. HET BEPALEN VAN HET EFFEKT VAN CHEMIKALIËN OP VERTEGEN- WOORDIGERS VAN HET AQUATISCH ECOSYSTEEM

Een van de belangrijkste bekommernissen van alle organisaties betrokken in de gezondheidszorg en bescherming van het leefmilieu is de normstelling voor het inbrengen van toxische chemikaliën in aquatische milieus. Voor het opstellen van deze normen moeten drie verschillende types onderzoek worden beschouwd :

1) het onderzoek dat de klassieke relatie tussen de toegediende dosis toxikans en het effect op het testorganisme bepaalt. Dit onderzoek omvat zowel experimenteel werk in het laboratorium als waarnemingen of "survey", en goed geprogrammeerde experimenten in de natuurlijke omgeving.

In dit onderzoek kunnen beide variabelen, dosis en effect, de onbekenden zijn. Enerzijds kwantificeert men meestal het effect van een bepaalde dosis toxikans op een bepaald organisme in bepaalde omstandigheden. Anderzijds werden enkele bioassays ontwikkeld waarbij in gecontroleerde proefomstandigheden, het antwoord van het testorganisme zodanig reproduceerbaar is, dat de biologische toets ten minste even, zo niet méér gevoelig is dan de nodige chemische analyses voor het doseren van dit bepaald produkt. Het is bovendien ondenkbaar dat men water op een niet-biologische wijze snel en volledig kan onderzoeken op mogelijke aanwezigheid van welke toxische stof dan ook.

In het geval van een gecontroleerde bioassay kan enerzijds na een voorafgaand onderzoek, de dosis achterhaald worden die overeenstemt met een bepaald waargenomen effect op het test-organisme. Anderzijds, kan het antwoord van het test-organisme als abstrakte maatstaf worden gebruikt ter vergelijking van meerdere produkten.

Biologen betrokken in het pollutieonderzoek houden jammer genoeg te weinig rekening met de standaard-testen ontwikkeld door farmakologen en statistiekers voor het uittesten van geneesmiddelen. Vele van deze technieken kunnen immers mits enkele aanpassingen met succes gebruikt worden in het toxiciteitsonderzoek in functie van het leefmilieu (SPRAGUE, 1969).

Door dit gebrek aan koördinatie beschikt men momenteel over lijsten met lethale en sublethale dosissen van honderden verschillende chemikaliën voor honderden verschillende test-organismen in steeds weer verschillende omstandigheden (McKEE en WOLFE, 1963). Daarom wordt door verschillende organisaties naar uniformiteit gestreefd (Europa : Direction Protection Sanitaire, Commission des communautés Européennes ; USA : American Public Health Association ; Committee on Aquatic Bioassays, National Water Quality Laboratory).

2) het onderzoek dat de relatie tussen de toegediende dosis en de grootte van het teruggevonden residu in het test-organisme bestudeert.

Dit onderzoek heeft zich opgedrongen door het optreden van sterfte en ziekteverschijnselen bij hogere organismen (vis, vee en ook de mens) te wijten aan accumulatie van het toxikans. Dit verschijnsel wordt ook 'biological magnification' genoemd. Een schoolvoorbeeld hiervoor is de kwikvergiftiging van de visetende bevolking van Minamata, Japan, te wijten aan een accumulatie van kwik in eetbare zeeprodukten. Het kwik was afkomstig van het HgCl_2 dat werd gebruikt als katalisator voor de produktie van polyvinylchloride (PVC). De meeste mariene organismen bleken weinig hinder te ondervinden van het hoge kwikgehalte dat in het zeewater werd geloosd, maar ze accumuleerden het zware metaal in een dergelijke mate dat voor de mens, in talrijke gevallen een dodelijke grenskoncentratie was bereikt (HOSOKAWA et al., 1956 ; KURLAND et al., 1960 ; UI, 1966). In het marien milieu ontbinden de meeste kwikverbindingen in anorganisch kwik (Hg metaal, HgCl_4^{2-} , HgS). Het anorganisch kwik wordt progressief omgezet in methyl-kwik dat zeer toxisch is en de neiging vertoont langs de voedselketen te worden geaccumuleerd (JENSEN en JERNELOV, 1969).

Ontelbaar zijn de rapporten waarin de teruggevonden residus van bepaalde chemikaliën in de meest verscheidene organismen worden beschreven. De initiële dosis in het natuurlijk ecosysteem die verantwoordelijk is voor deze residus is meestal onbekend. Daarom wordt thans zowel in het laboratorium als in gecontroleerd veldonderzoek een aanvang gemaakt met het bepalen van de relatie dosis-residu.

Een nevenaspect dat in feite het meest verband houdt met het onderzoek van de relatie dosis-residu, maar zeker en vast in elk facet van het pollutieonderzoek meespeelt, is de verzameling van chemische en fysische eigenschappen van de bestudeerde toxikans evenals van het test-biotoop of test-recipient.

De 'partitionering' of verdeling van een chemisch produkt tussen de 3 mogelijke fasen, vast, vloeibaar en gasvormig in een natuurlijk of experimenteel biotoop, is immers bepalend voor de resultaten van voornoemde relaties : dosis-effekt en dosis-residu (KENAGA, 1974).

3) de derde relatie effekt-residu, vormt in feite de syntese van de twee voorgaande. Het komt er enerzijds op aan de biologische betekenis van een bepaald residu in een organisme te achterhalen. In het aangehaalde voorbeeld van de Minamata-ziekte, had de hoge dosis kwik in het weefsel van de mariene organismen, nog geen nadelige gevolgen voor het dier zelf, maar wel voor de mens die door het eten van dit produkt een dosis kwik had opgenomen die ver boven de tolerantiegrens gelegen was.

De relatie effekt-residu is kenmerkend voor elk produkt, uiteraard in functie van het test-organisme, en laat het best toe het werkingsmechanisme van een toxikans te verstaan.

Enkele algemene beschouwingen zijn :

- een produkt kan doorgaans maar actief geakkumuleerd worden tot concentraties ver boven de concentratie van het omringend milieu, indien het effekt van het produkt op het test-organisme minimaal is, zodanig, dat de stofwisseling van het organisme die verantwoordelijk is voor de biologische vermeerdering, niet wordt geremd. Het toxisch effekt kan evenwel stimulerend zijn, waardoor dus de akkumulatie wordt geactiveerd.
- sommige produkten hebben een zodanig specifiek toxisch effekt op vitale functies van de test-organismen, zodat deze eerder ten gronde gaan aan de negatieve effecten van het produkt alvorens de kans te grijpen de stof in één of ander deel van het lichaam op te slaan. In dit geval, zelfs "post mortem" kan er een 'passieve akkumulatie' optreden door diffusie,

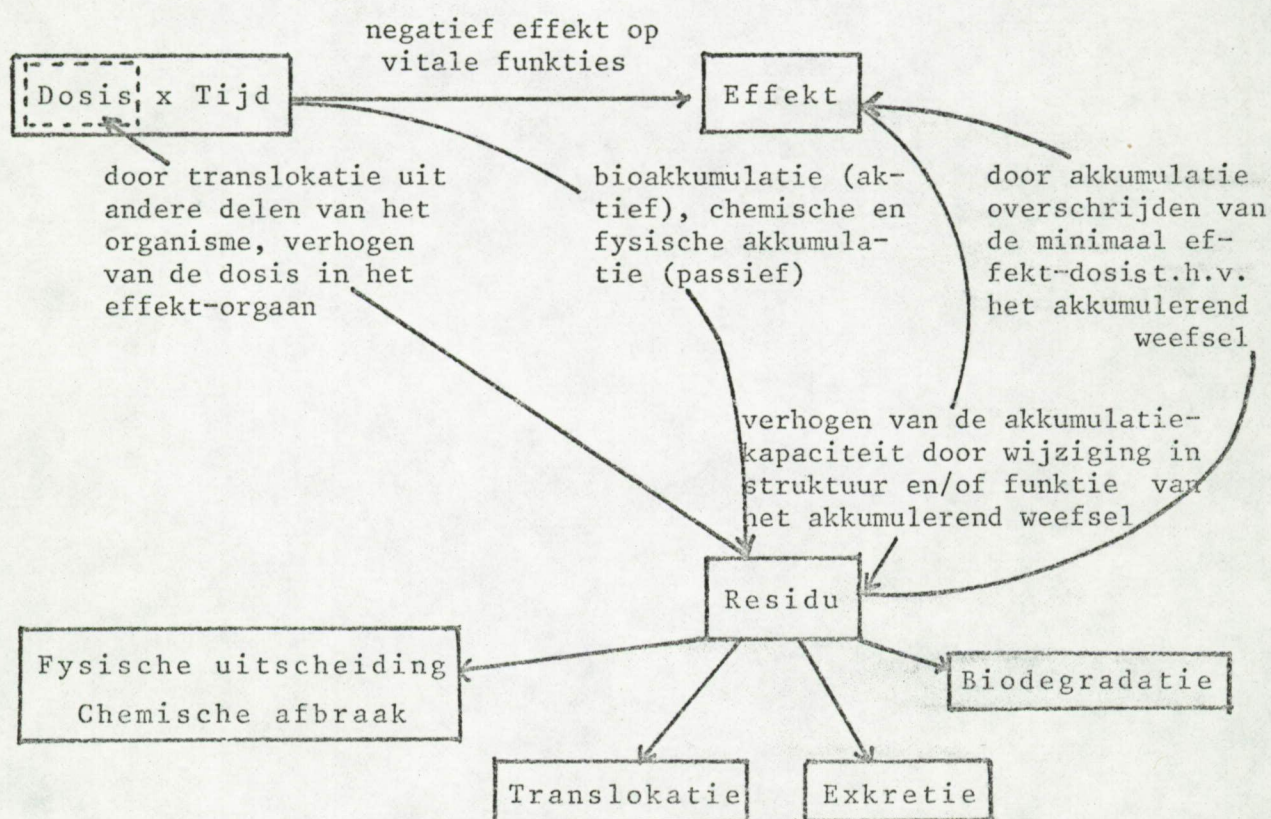
af- en adsorptie enz..., maar waarbij het residu zelden de concentratie van het omringend milieu overschrijdt.

- de plaats in het organisme ter hoogte waarvan het determinerende toxische effect wordt uitgeoefend, is niet noodzakelijk de plaats waar het produkt in kwestie wordt geakkumuleerd.

- biodegradatie, exkretie, translokatie, fysische uitscheiding en chemische afbraak bepalen o.a. het residu in de verschillende organen van de test-organismen en werken allen in de tegengestelde richting van de aktieve en passieve akkumulatie.

Alle voornoemde processen zijn bovendien funktie van de tijd, de proefomstandigheden en de konditie van de test-organismen.

Onderstaand schema resumeert deze verschillende punten :



Proefomstandigheden
Konditie test-organismen
Tijd

De 'dosis-effekt' relatie wordt bestudeerd door het toxisch effect van het produkt op bepaalde organismen te bepalen, terwijl de studie van de relatie 'dosis-residu' onderzoeken i.v.m. de accumulatie van het produkt omvat. De 'effect-residu' relatie kan men evenwel slechts onderzoeken aan de hand van een gekombineerd onderzoek naar de toxiciteit en de accumulatie van het produkt in kwestie.

3. GEBRUIK VAN DE ONDERZOCHE HERBICIDEN IN DE LANDBOUW EN WETTELIJKE VOORSCHRIFTEN HIEROMTRENT

3.1. Gebruik in de landbouw

Paraquat is een bladherbicide dat van toepassing is als "pre-emergens" onkruidbestrijder tot 2 dagen vóór de opkomst van het gewas.

Onder fruitbomen wordt het ook als "post-emergens" aangewend tegen overblijvende grassen (AMLING et al., 1963).

Het is zeer geschikt voor "chemisch maaïen" van onkruid, ontbladeren van hop, verjonging van aardbeiplanten en graslandvernieuwing (STRIJCKERS, 1970).

Een verhoogd stikstofgehalte maakt de planten gevoeliger voor paraquat maar verhoogt tevens hun herstelcapaciteit; fosfor heeft een analoog effect op de gevoeligheid, niet op het herstel (LUTMAN et al., 1974; PETERS et al., 1975). Deze verhoogde gevoeligheid door stikstof is o.a. te wijten aan een grotere "spray-retentie" en bevochtigingsgraad van de bladeren.

Paraquat wordt het meest gebruikt voor bestrijding van oevergewassen en sublittorale watervegetatie (STRIJCKERS op. cit.; LAWRENCE et al., 1963; FUNDERBURK & LAWRENCE, 1963a). Het wordt ook vaak aangewend ter verdelging van waterkroos (Lemna minor). Omdat dit kroos zo gevoelig is voor paraquat ontwikkelden FUNDERBURK & LAWRENCE (1963b) een biologische test met Lemna minor, waardoor zeer kleine concentraties paraquat in oppervlaktewaters kunnen gedetekteerd worden.

De hardheid van het water oefent een antagonistische werking uit op de toxiciteit van paraquat (PARKER, 1966).

Bij de bestrijding van onderwaterplanten is er op de bodem van de sloten niet voldoende licht aanwezig voor de normale werking van paraquat als bladherbicide (zie verder 4.1.2.) maar wordt het produkt daarentegen door de sapstroom opgenomen en heeft dus een "systemisch" effect. Dit is gunstig in verband met het traag afsterven van de planten.

De halveringstijd in water is 16 uur (STRIJCKERS op. cit.).

Diquat is eveneens een bladherbicide en kan zoals paraquat als "pre-emergens" tot één dag vóór de opkomst van het kultuurgewas gebruikt worden (STRIJCKERS, op.cit.). Het is een uiterst geschikt loofdoder voor aardappelen (CALDERBANK et al., 1961). De systemische werking met transport naar de knollen wordt vermeden door het herbicide aan te wenden bij zonnig weer.

Diquat wordt eveneens met sukses gebruikt tegen de onderwatervegetatie. Zoals voor paraquat dient dan wel de voorkeur gegeven te worden aan de systemische werking.

De halveringstijd in water is 24 uur (STRIJCKERS, op.cit.).

2,4-D is een bladherbicide met systemische werking en wordt aangewend ter bestrijding van dikotyle planten. Het wordt gebruikt tegen overblijvende onkruiden die met kontaktmiddelen niet kunnen gedood worden en ook tegen een aantal zaadonkruiden.

2,4-D is het meest gebruikte herbicide ter wereld door zijn breed spektrum en zijn grote efficiëntie tegen planten met een uitgebreid rhizomensysteem (STRIJCKERS, op.cit.).

3.2. Wettelijke voorschriften

De reglementering van het bewaren, verkopen en gebruiken van pesticiden en fytofarmaceutische produkten en de voorschriften vermeld op de erkenningsakten die werden opgesteld in naleving van het K.B. van 31 mei 1958, zijn in België nog steeds van kracht. Deze bepalingen voor de commerciële herbiciden die wij onderzochten luiden als volgt :

Reglone, een produkt van ICI/Belgium N.V. op basis van 195+10 g/l diquat-kation.

Reglone mag gebruikt worden voor het ontloven van konsumptieaardappelen, het verdelgen van éénjarig onkruid en bestrijding van de watervegetatie. In visvijvers mag de concentratie van het produkt de 5 ppm niet overschrijden.

Gramoxone ZU (zonder uitvloeier), een produkt van ICI/Belgium N.V. op basis van 200+10 g/l paraquat-kation.

Speciaal aan te raden voor het verdelgen van de aquatische vegetatie. In visvijvers mag het gehalte niet hoger zijn dan 5 ppm.

Gramoxone, een produkt van ICI/Belgium N.V. op basis van 200 g/l paraquat-kation en 10% van een mengsel van twee detergenten (uitvloeiers). Naargelang de dosis als selektief of totaal herbicide te gebruiken. Mag ook gebruikt worden voor het doden van waterplanten waarbij de concentratie in het water van visvijvers de 5 ppm niet mag overschrijden.

Aminex, een produkt van Protex N.V. op basis van 480 g/l triethanolamine-zout van het dichlorophenoxyazijnzuur of 2,4-D. Selektief herbicide ter bestrijding van éénjarige en overlevende dicotylen, o.a. de boven het water uitgroeiende aquatische vegetatie.

Gramoxone is geklasseerd bij de zeer giftige produkten en mag allen door erkende verkopers verkocht worden aan loonspuiters of aan beroepslandbouwers of tuinbouwers. Reglone en Aminex daarentegen mogen aan iedereen verkocht worden (NIERINCK, pers.med.).

De Belgische wetgeving in verband met de chemische bestrijding van waterplanten is enigszins dubbelzinnig omdat er niet gespecificeerd wordt of er 5 ppm gramoxone of reglone in het water mag aanwezig zijn of 5 ppm paraquat- of diquat-kation. Terwijl a posteriori alleen de concentratie paraquat of diquat-kation chemisch bepaald kan worden, is het toch het meest logisch dat in de voorschriften bedoeld wordt dat er slechts 5 ppm gramoxone of reglone mag worden toegediend. Dit zou dan overeenstemmen met 1 ppm kation. Wat betreft de toepassing van 2,4-D als aquatisch herbicide wordt er geen maximale dosis vooropgesteld!

In Nederland is het gebruik van gramoxone alleen zonder uitvloeiers toegelaten. De toepassing is beperkt tot de periode na 1 juni en de maximale concentratie in het water bedraagt 2 ppm gramoxone ZU (Groene Bericht, 21-03-1975, Plantenziektenkundige Dienst Wageningen).

De bepalingen voor reglone zijn dezelfde als voor graxone ZU. Van 2,4-D mogen geen esters gebruikt worden. Aminozouten zoals aminex kunnen wel worden aangewend. De toepassingsperiode begint slechts eind juni-begin juli, en de maximale toegelaten dosis in het water 1 à 2 ppm actieve stof, het water uit behandelde sloten mag gedurende enkele weken niet meer worden gebruikt voor land- of tuinbouw.

Het zoeken naar internationale normen verloopt zeer traag en een uniformiteit voor de Europese gemeenschap is nog niet in het vooruitzicht (VAN MELCKEBEKE, pers.med.).

4. EIGENSCHAPPEN EN KENMERKEN VAN DE ONDERZOCHE HERBICIDEN (LITERATUUROVERZICHT)

4.1. Paraquat en diquat

4.1.1. Fysische eigenschappen

Paraquat

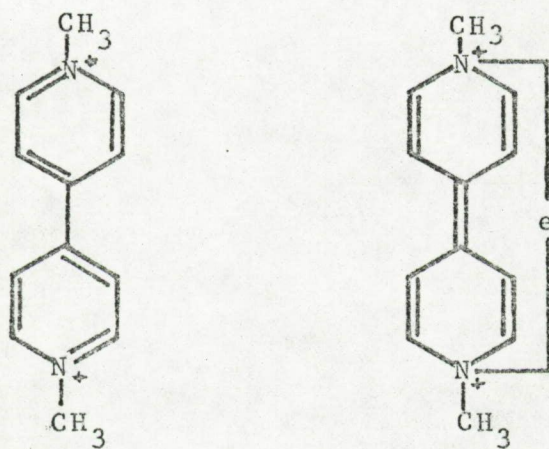
is een dipyridyliumderivaat, dat enkel voorkomt als tweewaardig kwaternair ammoniumion met chloor of methylsulfaat als tegenionen.

Het paraquat dimethylsulfaat heeft een MG van 408.4 en bevat 45.6% kation. Het paraquat dichloorion is een wit poeder, heeft een MG van 257.2 en bevat 72.4% kation (MG paraquat-kation : 186.3).

De paraquatzouten zijn zeer hygroscopisch en zeer goed water-oplosbaar (mits de pH < 11) ; ze zijn zeer weinig oplosbaar in de gewone organische solventia.

Het paraquatdichloride smelt (met onbinding) bij ongeveer 300°C.

Paraquat werd ontworpen door MICHAELIS (1932, 1933a, b) als een oxidatie-reduktie-indikator in biologische systemen. Hij noemde het "methylviologen" omwille van de helblauwe kleur van de tot radikaal gereduceerde vorm. Dit vrij radikaal is auto-oxiderend.



Figuur 1 : Structuur van het paraquat-kation en zijn gereduceerde vrije radikaalvorm (naar MICHAELIS, 1932).

Pas in 1960 ontdekten HOMER et al. (1960) de fytotoxische eigenschappen van dit produkt.

De ongereduceerde vorm van paraquat heeft een absorptie-maximum bij 257.5 nm ; de gereduceerde vorm bij 396 en 660 nm (PPRAM 1, 1972).

Paraquat heeft geen meetbare dampdruk en is bijgevolg niet of weinig vluchtig (SWAN, 1969).

Het kommerciële herbicide "Gramoxone" bevat $200 \text{ g} \pm 10 \text{ g}$ paraquat-kation per liter water, met 3 buffers en 2 detergenten als additieven. In de Belgische formulering wordt $\pm 100 \text{ g}$ van een mengsel van twee detergenten toegevoegd (de samenstelling werd ons vertrouwelijk medegedeeld door ICI, Belgium Brussel). De twee tensio-aktieven zijn het niet-ionische lissapol NX, een nonylfenolethoxylaet en het kationische ethomeen S25 een tertiair amine ethoxylaet (ICI, Jealott's Hill Research Station, Bracknell, Berkshire, Engeland).

Het kationische paraquat kan niet gemengd worden met een anionisch detergent, aangezien reactie met kompleksere molekulen met anion-karakter tot inaktivering leidt.

Een tweede formulering zonder detergenten is eveneens op de markt en wordt "Gramoxone zonder uitvloeier" of "Gramoxone ZU" genoemd.

Beide gramoxone formuleringen en beide uitvloeiers werden in dit werk onderzocht op hun toxiciteit. De eerste formulering duiden we aan als paraquat met uitvloeiers of PMU en de tweede als paraquat zonder uitvloeier of PZU.

De zgn. uitvloeiers zijn tensio-actieve stoffen die de oppervlaktetension van de waterige herbicide-oplossing verlagen zodanig dat deze zich gemakkelijk uitspreidt over de bladeren van de ongewenste planten. Van beide uitvloeiers kan men een hydrofiel-lipofiel balans (H.L.B.) opstellen waaruit men de tensio-aktiviteit kan kwantificeren, m.a.w. bepalen in welke graad het produkt hydrofiel of lipofiel is. Hoe meer ethyleen-oxidekernen, hoe meer hydrofiel het produkt wordt.

Bladeren van hogere planten zijn bedekt met een waslaag die waterafstotend is. Een herbicide zonder uitvloeiers spreidt zich dan ook slecht over de bladeren uit.

De tensio-aktieve uitvloeiers daarentegen verhogen de werking van de wateroplosbare herbiciden in grote mate (STRIJCKERS, 1970), vermits door toevoeging van een uitvloeier de oppervlaktespanning van de waterige fase vermindert, bovendien bevat de uitvloeier lipofiele elementen. Op die manier wordt het herbicide goed over de bladeren uitgespreid en bereikt het een optimale werking.

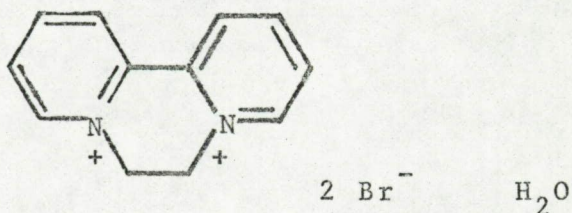
Diquat

Deze verbinding is een homoloog van paraquat, met meestal broom of chloor als tegenionen. Het diquat dibromide monohydraat is een gele kristallijne stof met een MG van 362.1 en bevat 50.9% kation. Het diquat dichloride heeft een MG van 273.2 en bevat 67.4% kation. (MG diquat-kation : 184.2).

De diquat-ionen zijn zeer hygroskopisch, zeer goed wateroplosbaar (70 g/100 ml water bij 20°C) maar weinig oplosbaar in organische solventia.

In neutraal en licht zuur milieu is diquat vrij stabiel maar in alkalisch milieu ontbindt het met vorming van gekleurde complexen (door opening van een van de pyridine-ringen en opname van een alkali molekule) (STRIJCKERS, op.cit.).

Diquat smelt bij circa 300°C.



1,1'-ethyleen-2,2'-dipyridylium-dibromide
monohydraat

Figuur 2 : Structuur van het diquat-kation.

Diquat werd in 1955 door R. IFIELDEN gesynthetiseerd in het "Laboratory of Dyestuffs Division of ICI, Blackey, Engeland, als homoloog van paraquat ; in 1958 ontdekten BRIAN et al (1958) de herbicide eigenschappen van dit produkt.

Diquat kan eveneens tot het vrije radikaal gereduceerd worden, dat fel groen gekleurd is en auto-oxiderend.

De niet-gereduceerde vorm van diquat heeft een absorptie-maximum bij 310 nm ; de gereduceerde vorm bij 378 nm (PPRAM 7, 1972).

4.1.2. Paraquat en diquat - Werking in planten

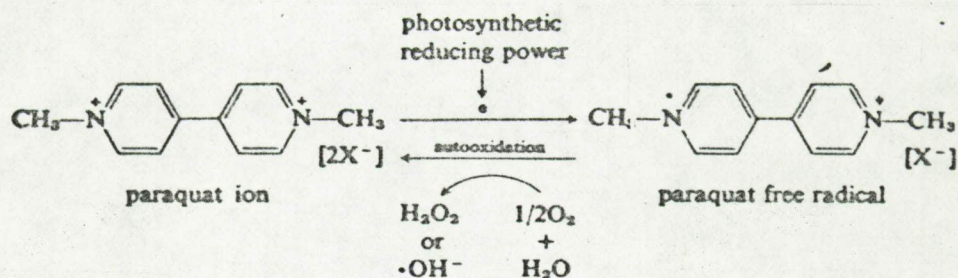
De dipyridyliumderivaten, paraquat en diquat, zijn 2 typische voorbeelden van de meest gebruikte herbiciden. Hun effect is bijzonder doeltreffend : de planten worden onmiddellijk gedood na het contact van de scheikundige stof met de groene plantendelen. In de bodem adsorberen beide produkten op kwasi irreversibele wijze aan de kleimineralen waardoor ze geïnactiveerd en dus ongevaarlijk worden.

Paraquat en diquat zijn twee heterocyclische componenten van de dipyridylium kwaternaire ammoniumzouten-kategorie. Reeds lang waren ze gekend als redox-indikatoren, maar het is slechts in 1958 dat ook hun herbicide werking werd aangetoond (BRIAN et al., 1958). Stoffen van dit type kunnen gereduceerd worden tot intens gekleurde, relatief stabiele vrije radicalen (MICHAELIS & HILL, 1933) en deze eigenschap blijkt aan de basis te liggen van hun herbicide werking. Onvolledige reductie van het tweewaardig kation geeft aanleiding tot een radikaal met 1 vrij elektron dat alle plaatsen in het gekonjugeerde systeem kan innemen waardoor de resonantiestructuur stabiel is. Substitutie van de ringen breekt dit gekonjugeerd systeem, de molekule is niet meer koplanaar, waardoor de redoxreactie wordt verhinderd.

De herbicide eigenschap van deze produkten is eveneens geassocieerd met hun redoxpotentiaal. Alleen componenten met een redoxpotentiaal minder negatief dan -800 mV bezitten een herbicide werking. De meest aktieve stoffen zijn deze met een redoxpotentiaal tussen -300 tot -500 mV. Diquat heeft een redoxpotentiaal van -349 mV en paraquat -446 mV (HOMER et al., 1960).

Niettegenstaande de stabiliteit van deze radicalen zijn ze in staat terug te oxideren in aanwezigheid van moleculaire

zuurstof, met een regeneratie van de oorspronkelijke molekuule. Deze reoxidatie is ook een reactie met slechts 1 elektron zodat het duidelijk is dat er nieuwe vrije radicalen moeten gevormd worden. De reductie gevolgd door deze autoöxidatie is de sleutel van de herbicide werking van de dipyridylum derivaten. In Fig. 3 worden deze reacties voor paraquat weergegeven (ASHTON & CRAFTS, 1973).



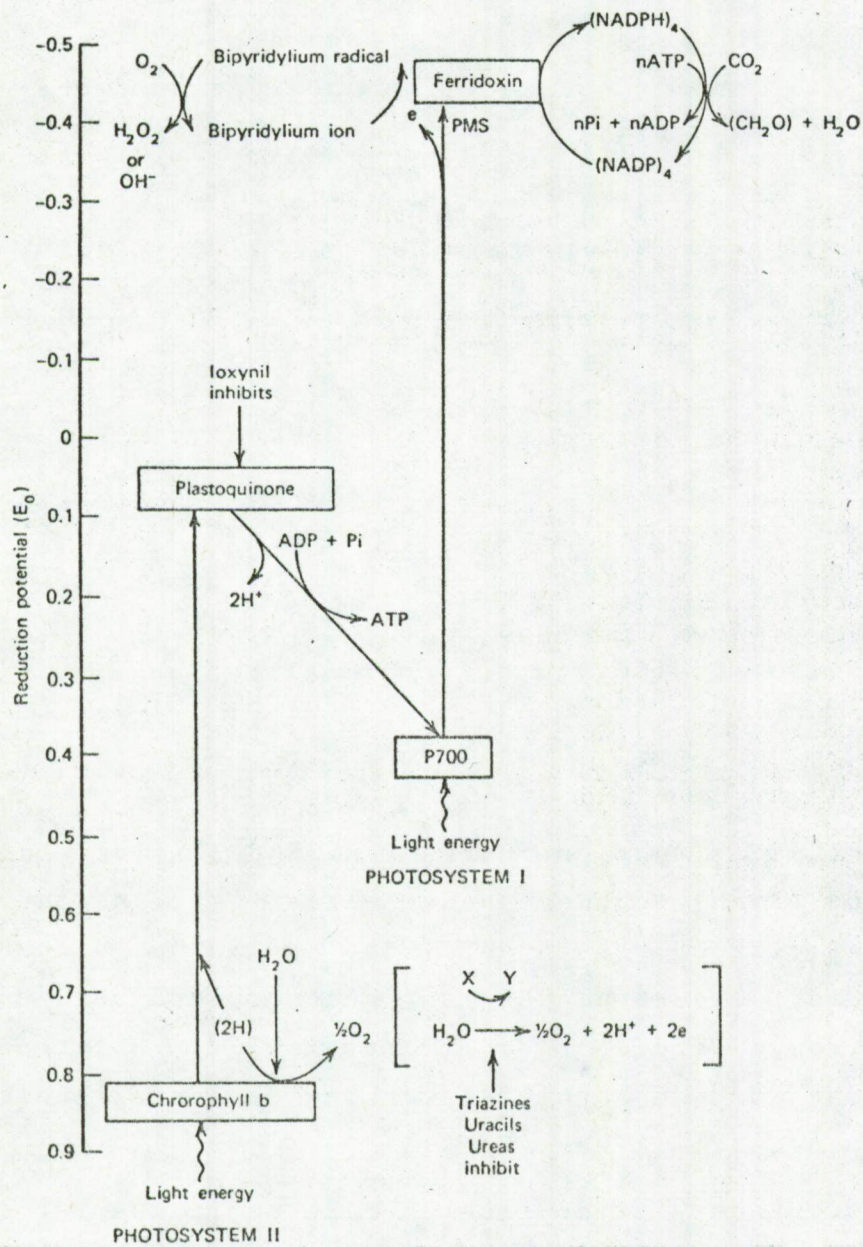
Figuur 3 : Omzetting van het paraquat-ion tot het vrij radikaal, en autoöxidatie van dit radikaal met vorming van H₂O₂ of OH⁻. (naar ASHTON & CRAFTS, 1973).

Fotosynthese, licht en zuurstof zijn de limiterende factoren. MEES (1960) toonde aan dat het effect van diquat op planten veel vlugger was in het licht dan in het donker en dat in het donker, diquat alleen maar geabsorbeerd werd en slechts geactiveerd werd door een lichtstimulus. Hij toonde eveneens aan dat voor de herbicide werking de aanwezigheid van zuurstof noodzakelijk was.

De fotosynthese zet de lichtenergie om in chemische energie via een reeks elektronentransfers tot de vorming van NADPH en ATP, die nodig zijn voor de CO₂-fixatie.

Stap voor stap werd bewezen dat de dipyridylum de CO₂-fixatie inhiberen (COUCH & DAVIS, 1966 ; VAN OORSCHOT, 1964 ; ZWEIG, 1969) dat diquat als een "electron carrier" kan optreden (DAVENPORT, 1963 ; ZWEIG & AVRON, 1965) en kompetitief de NADP-reductie in geïsoleerde chloroplasten inhibeert (DAVENPORT, 1963). BLACK & MEYERS (1966) bewezen de analoge werking van paraquat.

Biochemical Responses to Herbicides



Figuur 4 : Vereenvoudigd model van de fotosynthese met aanduiding van de inwerking van verschillenden herbiciden op de fotosynthese. (naar ASHTON & CRAFTS, 1973).

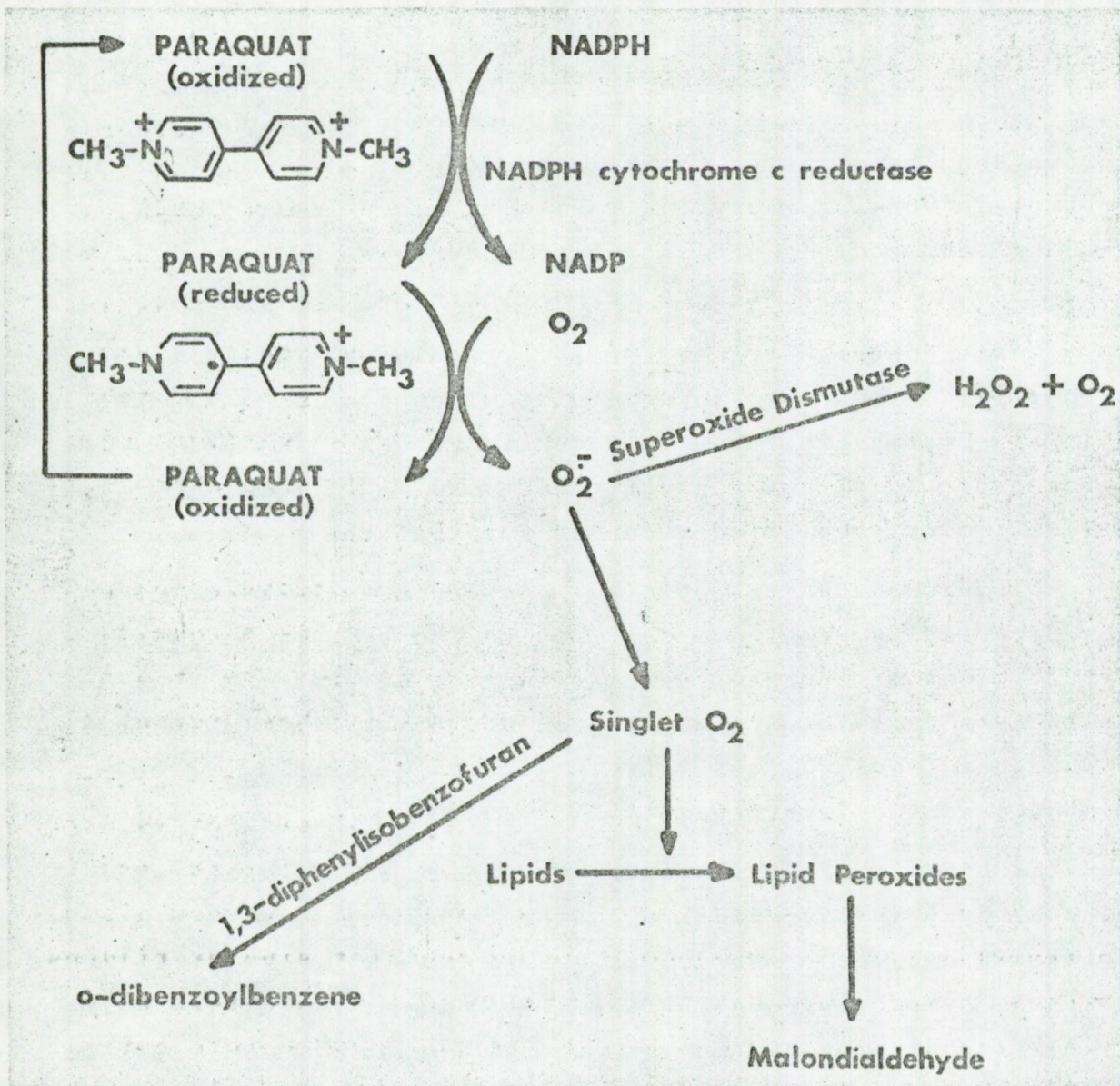
In Fig. 4 uit ASHTON & CRAFTS (op.cit.) worden de plaatsen waar verscheidene herbiciden interfereren met de plantenfysiologie weergegeven. Diquat en paraquat werken in op dezelfde plaats als het PMS (phenazine methosulfaat) en kunnen dus een kortsluiting vormen voor de elektronenoverdracht van ferredoxin naar NADPH. Een fytotoxische werking in het donker is niet uitgesloten omdat de nodige elektronen voor de reductie van het dipyridylum-ion ook kunnen geleverd worden door respiratie. Maar in normale milieuomstandigheden gebeurt de vorming van vrije radicalen via de fotosynthese in het daglicht zodanig snel dat het aandeel van de produktie aan radicalen via respiratie te verwaarlozen is.

Wat echter het zeer snelle fytotoxische effect van deze herbiciden betreft kan deze niet alleen toe te schrijven zijn aan de inhibitie van de reductie van NADP tot NADPH. Het onrechtstreeks effect van het tekort aan NADPH op de CO_2 -fixatie is immers veel trager dan de fytotoxische symptomen.

ASHTON & CRAFTS (op.cit.) verwerpen de hypothese dat het dipyridylum-radikaal zelf een toxisant is op basis van het feit dat er zuurstof vereist is voor de maximale ontwikkeling van de fytotoxische symptomen. Bovendien worden er in afwezigheid van zuurstof vrije radicalen geakkumuleerd omdat de autoöxidatie is stopgezet.

BLACK & MEYERS (op.cit.) menen dat bij de reoxidatie van het dipyridylum radikaal waterstofperoxide wordt gesynthetiseerd dat verantwoordelijk zou zijn voor de snelle fytotoxische symptomen. CALDERBANK (1968) meent dat de reactieve hydroxyl-radicalen hierin ook een rol kunnen spelen, omdat de katalasen en peroxidasen die veelvuldig aanwezig zijn in hogere planten het grotendeel van het geproduceerde peroxide kunnen afbreken.

DODGE et al. (1970) vonden echter tijdens "in vitro"-proeven over de reoxidatie van paraquat- en diquat-radicalen, hetzij geen hetzij kwasi ondetekteerbare kleine hoeveelheden andere vrije radicalen terug. Zij zoeken dan ook een verklaring voor de fytotoxiciteit in het optreden van lipiden-peroxidatie. Doch tegelijkertijd achten zij het mogelijk dat het gevormde peroxide onbereikbaar is voor de katalasen en peroxi-



Figuur 5 : Vooropgesteld werkingsmechanisme van paraquat in dierlijke organismen (naar GIBSON, 1975).

dasen of dat de gevormde vrije radicalen "in vivo" minder stabiel zijn dan "in vitro".

BAUR et al. (1969) onderzochten het effect van paraquat op de ultrastructuur van de bladeren en registreerden binnen de eerste 5 minuten na de behandeling bij 39% van de cellen een desintegratie van het plasmalemma, en na 40 minuten een disruptie van het chloroplastmembraan. De achtereenvolgende symptomen zijn (FARRINGTON et al., 1973) : vooreerst openingen in het chloroplastmembraan, gevolgd door opzwellen en barsten van de chloroplast, dan scheuren van het membraan rond de vakuole waardoor het vocht van de vakuole zich mengt met het cytoplasma en ten slotte het barsten van het plasmalemma waardoor de celinhoud buiten de celwand treedt. Deze symptomen komen overeen met belangrijke morfologische veranderingen : door het doorbreken van de membranen verliest het blad zijn stevigheid, treedt er necrosis op gevolgd door het afsterven van het blad.

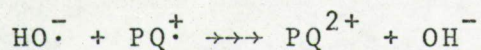
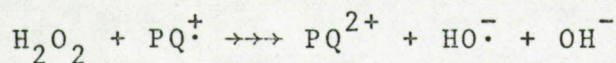
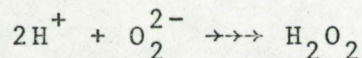
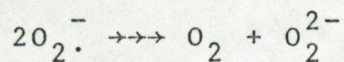
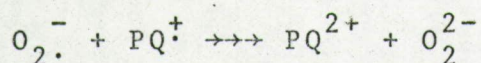
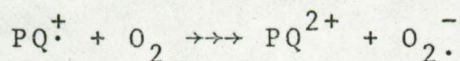
BROOKS (1971) meent dat de lipiden-peroxidatie ten gevolge van de vorming van waterstofperoxide bij de autoöxidatie van het paraquat-radikaal, verantwoordelijk is voor het doorbreken van de celmembranen zoals hierboven beschreven.

Doch uit de proeven van GIBSON (1975) kan men besluiten dat het superoxide-radikaal en/of zuurstof singlet is dat de lipidenperoxidatie induceert, eerder dan het waterstofperoxide. Hij stelt het werkingsmechanisme van paraquat voor als een reductie van O_2 tot superoxide en zuurstof singlet tijdens de reoxidatie van paraquat (Fig. 5). Omdat deze auteur zijn proeven heeft uitgevoerd met dierlijk NADPH-cytochrome c reductase, wordt dit hypotetisch werkingsmechanisme alleen voor dierlijke organismen voorgesteld ; het is nochtans absoluut niet uitgesloten dat het herbicide in planten op volledig analoge wijze werkt.

Argumenten hiervoor vindt men bij FARRINGTON et al. (1973) die het ontstaan van het superoxide-radikaal O_2^- intermediair tussen O_2 en H_2O_2 in plantencellen voor mogelijk houdt : "Such a radical is a possibility for the phytotoxic species, provided it can survive long enough to diffuse to

the cell membranes, which is where damage is first observed in plants treated with paraquat".

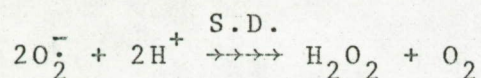
De opeenvolgende reakties zijn volgens deze auteurs :



De zeer snelle omzetting van het superoxide-radikaal sluit zijn fytotoxische aktiviteit niet uit omdat het radikaal in de onmiddellijke nabijheid van de getroffen membranen wordt gevormd.

Tot op heden werd nog niet bewezen of het superoxide-radikaal ofwel het waterstofperoxide het fytotoxisch produkt is. Beide produkten kunnen heel verscheiden stabiliteit en reaktiviteit hebben "in vitro" en "in vivo", omdat "in vivo" een reeks enzymen voorkomen die de omzetting van deze stoffen kunnen bespoedigen (respektievelijk superoxide-dismutase, katalase en peroxidase). Katalase en superoxide-dismutase komen voor in alle aerobe organismen die een cytochroom systeem bezitten, noodzakelijk voor een aerobe respiratie.

Superoxide dismutase (S.D.) induceert de reactie :



Het algemeen voorkomen van superoxide-dismutase wijst er op dat het superoxide-radikaal veelvuldig voorkomt ; dit tengevolge van de univalente reductie van moleculaire zuurstof. Doch fysiologisch is het een zeer ongewenste komponent.

McCORD et al. (1971) stelt enerzijds dat : "The low rate of production, and its relative chemical stability enables H_2O_2 to diffuse from these cells (where it was produced) without causing damage. An accumulation of H_2O_2 in the medium

surrounding these cells would be prevented by the catalatic action of substances in the medium or, in a mixed culture, by the catalatic action of other species of cells containing catalase".

Anderzijds : "It appears possible that the dismutation of superoxide radicals may be the single most important enzymic activity for enabling organisms to survive in the presence of molecular oxygen. Presumably, the great chemical reactivity of superoxide anion precludes the possibility of depending upon diffusion from the cell as a means of disposal of this radical and necessitates the presence, within the cell, of superoxide dismutase".

Welke het fytotoxisch element is, is nog steeds niet uitgemaakt maar uit de dierlijke fysiologie krijgen we steeds meer argumenten om aan te nemen dat het superoxide-radikaal zeer zeker pathogene eigenschappen heeft (FEE & TEITELBAUM, 1972) (zie 4.1.5.).

4.1.3. Dierlijke en menselijke pathologie

Paraquat en Diquat

In vergelijking met andere chemikaliën zijn de dipyridylumderivaten weinig toxisch. Doch dodelijke ongevallen door het drinken van gekoncentreerde paraquat-oplossing (200 g/l) en de ongewone pathologische verschijnselen hiermee gepaard gaande, bezorgden deze produkten een grote belangstelling vanwege de toxikologen. In de periode van 1964 tot 1973 waren er 232 paraquat-vergiftigingen met dodelijke afloop, 96 intoxicaties gebeurden per ongeluk, 109 gevallen waren zelfmoorden en in 27 gevallen was de vergiftigingsoorzaak onbekend.

Paraquat en diquat veroorzaken een van elkaar verschillende, doch ongewone pathologie ; de reactie op lokaal contact met de huid en slijmvliesen is voor beide produkten nochtans identiek en miniem : een plaatselijke roodheid gevolgd door hyperkeratosis (verdikking van het stratum corneum) met eventuele puistenvorming (CONNING et al., 1969). De produkten worden systemisch opgenomen indien het stratum corneum wordt beschadigd en zijn impermeabiliteit voor wateroplosbare produkten verliest (SWAN, 1968).

Slijmvliezen worden bijgevolg veel gemakkelijker aangetast en belangrijke necrotische ulceraties van tong, mond, keel en farynx kunnen reeds binnen de 2 a 3 dagen na de orale opname worden waargenomen. Dergelijke verschijnselen treden ook op ter hoogte van de konjunktiva en het cornea epitheel na plaatselijk contact met paraquat of diquat, en worden gevolgd door lensopacifikatie. Al deze symptomen zijn echter reversibel.

De systemische toxiciteit van paraquat en diquat is verschillend :

Paraquat

Een éénmalige toediening van een grote dosis paraquat "per os", subcutaan of intraperitoneaal heeft een zelfde reeks symptomen voor gevolg (CLARK et al., 1966).

Binnen de 24 uur is er nog geen systemische pathologie waar te nemen en de adsorptietherapie met gesteriliseerde fuller's aarde (CLARK, 1971) heeft bijgevolg sukses indien onmiddellijk toegepast. Vanaf 3 uur daalt het sukses geleidelijk. Vanaf 2 tot 5 dagen zijn de symptomen bij de mens (ademhalingsmoeilijkheden) te vergelijken met een O₂-vergiftiging (FISCHER et al., 1973), met aantasting van de longen op irreversibele wijze. Histopatologisch vertonen de longen een typische paraquat-beschadiging, die niet voorkomt bij intoxicatie met andere dipyridyliums een zogenaamd profylatoir alveolitis en een terminaal bronchiolitis (CLARK et al., op. cit.): chronologisch is er een dilatatie en verhoogde permeabiliteit van de pulmonaire bloedvaten met hemoragieën als gevolg, een vernietiging van de gas-uitwisselende weefsels met verlies van de alveolaire wanden, en dilatatie of collaps van sommige alveoli (BROOKS, 1971 ; MURRAY & GIBSON, 1972 ; FISHER et al., op.cit. ; BORCARD et al., 1974). Het surfactant van de longen wordt vernietigd (FISHER et al., 1975 ; ROBERTSON, 1973) (zie 4.1.5), makrofage cellen worden in grote mate geproduceerd en vullen de longalveolen (STYLES, 1974 ; SWAN, op.cit.) samen met het surfactant (KIMBOUGH, 1974). Dit leidt tot een massief longoedeem. In latere stadia en ook bij chronische opname ontwikkelt zich een fibrosis door een verhoogde fibrine-afzetting veroorzaakt door het fibrinogeen aanwezig in het oedeemvocht en het groot aantal aanwezige fibroblasten

aangevoerd langs de bloedbanen (CONNING et al., op.cit.). In dit stadium worden de longen een massa van fibreus weefsel (FLETCHER, op.cit.). De dood treedt in ten gevolge van anoxie veroorzaakt door een ontoereikende gasuitwisseling.

Een van de eerste tekenen van een systemische paraquat-vergiftiging is verhoging van de bloedurea te wijten aan een necrosis van de niertubuli (OREOPOULOS et al., 1968 ; FOWLER & BROOKS, 1971). Doch de nierletsels zijn nooit als een primaire doodsoorzaak gesignaleerd (FLETCHER, op.cit.). Geforceerde diuresis (FENNELLY et al., 1971 ; HENSEL & DURR, 1971) kan als therapie worden gebruikt. Ook necrosis van de levercellen komt frekwent voor (BULLIVANT, 1966), ook niet rechtstreeks dodelijk. De hartletsels kunnen daarentegen wel verantwoordelijk zijn voor de dood, alhoewel er bij autopsie slechts een geringe beschadiging van het weefsel waar te nemen is (MASTERSON & ROCHE, 1970) ; misschien wordt het hart door de algemene slechte lichaamstoestand te zwaar belast.

Het verband tussen de histopatologische verschijnselen en het fysiologisch werkingsmechanisme van paraquat wordt door vele onderzoekers gezien in de vernietiging van de membraanstructuren door een peroxidatie van de fosfolipiden in aanwezigheid van het superoxide-radikaal.

Uit een histologisch onderzoek van menselijk longweefsel, meent POCHE (1974) te mogen besluiten : "Through the present investigations it was possible to demonstrate for the first time that paraquat leads to a diffusely beginning, step-wise destruction of the alveolar epithelium, the capillary endothelial cells, the alveolar cells, the blood capillaries, and finally the whole of the lung alveoli". De fibrosis door een proliferatie van het longbindweefsel is slechts een sekundair effect.

Diquat

Intraveneus, intraperitoneaal en subcutane toediening van diquat veroorzaken een over-excitatie die kan leiden tot stuipen (CONNING et al., op.cit.). Bij de mens worden lokale hemoragieën van de slijmvliezen ter hoogte van de mond, keel en oesofagus vastgesteld. Er treedt tevens een anurie op.

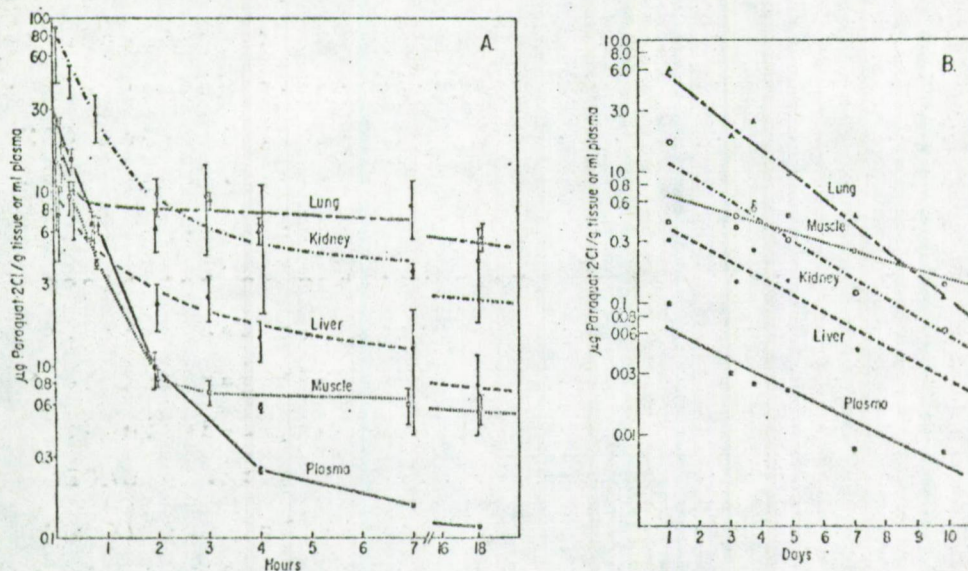
In het geval beschreven door OKONEK & HOFMAN (1975), was hemodialyse niet succesrijk en stierf de patiënte 46 dagen na het innemen van een onbekende hoeveelheid diquat. De doodsoorzaak werd niet omschreven.

Bij honden en konijnen veroorzaakt innemen van diquat (per os) beschadiging van de bovenste spijsverteringswegen met een vernietiging van de maagmucosa en in sommige gevallen maagperforatie (SWAN, 1968). De maag zet uit en de maaginhoud is hevig groen gekleurd, te wijten aan galpigmenten (biliverdine) (SWAN, op.cit.) of aan een bakteriële reductie van het diquat tot het groene radikaal (CONNING et al., op.cit.). Geen longletsels konden worden vastgesteld (STYLES, op.cit.). Enkel een voortschrijdende intestinale stasis, met een grote uitzetting van de dikke darm voor gevolg. Er kon geen farmakologische werking van diquat op geïsoleerd dierlijk darmweefsel worden aangetoond die zouden verantwoordelijk zijn voor dit effect. De histologische kenmerken van de darmmucosa, -spieren en zenuwplexussen, zijn ook bij een sterk uitgezette dikke darm, volledig normaal (SWAN, op.cit.). Een chronisch effect van diquat ter hoogte van de ogen werd waargenomen bij honden na 10 maanden voeden met 15 mg/kg lichaamsgewicht per dag ; en na 124 dagen bij ratten gevoed met 50 mg/kg per dag ; namelijk een bilateraal cataract (CONNING et al., op.cit.).

Wat de teratogene eigenschappen van paraquat en diquat betreft : beide produkten hebben geen teratogeen effect op kipembryos (DUNACHIE & FLETCHER, 1967). Bij ratten daarentegen verhoogt een éénmalige intraperitoneale inspuiting met een hoge dosis paraquat of diquat (respektievelijk 6.5 en 7 mg kation/kg lichaamsgewicht) de prenatale embryonale en adulte sterfte en heeft een teratogeen effect op de foetus, onafhankelijk van het tijdstip van de zwangerschap waarop het produkt werd ingespoten. Herhaalde inspuitingen met een lagere dosis hebben voor beide produkten geen effect. 7 mg kation/kg diquat veroorzaken afwijkingen van het skelet : er is geen mediane fusie van het sternum en geen ossifikatie van de eerste drie sternebrae. Een van de gehoorbeentjes kan ontbreken ofwel treedt er geen ossifikatie op. 6.5 mg kation/kg

Species	LD ₅₀ (mg./kg. body-wt.)	Peak concentration of paraquat in the blood (µg./ml.)	Absorption (%)
Rat	125	3-4	15-20
Guinea-pig	30	1	5-10
Cat	35-50	13	16 (excreted in 5 hr.)
Cow	35-50	—	0.26
Man	> 40	—	1-5

Tabel 1 : Toxiciteit van paraquat bij orale toediening aan verschillende diersoorten (naar CONNING, FLETCHER en SWAN, 1969).



Figuur 6 : Concentratie van paraquat in plasma en weefsel van ratten na een intraveneuze toediening van 20 mg paraqua- dichloride / kg lichaamsgewicht.
A. Gemiddelde waarden voor 4-5 ratten \pm standaard deviatie
B. Gemiddelde waarden voor 2 ratten.
De meeste ratten werden slechts in geringe mate door het paraquat aangetast, en dode ratten werden niet in beschouwing genomen.

RATIO OF CONCENTRATION OF PARAQUAT/DIQUAT
IN TISSUES OF THE RAT^a

Organ	Day				
	1	3	5	7	10
Lung	8	33	12	10	20
Muscle	2	13	10	7	16
Kidney	0.9	0.9	0.9	0.3	0.25
Liver	0.4	0.7	0.7	0.5	0.2

^a Paraquat 2Cl or diquat 2Cl (20 mg/kg) given iv to Sprague-Dawley rats (average of 2 rats).

Tabel 2 : Verhouding tussen de concentratie paraquat en diquat opgehoopt in ratweefsel (naar SHARP, OTTOLENGHI en POSNER, 1972).

paraquat veroorzaakt minder embryonale afwijkingen : in 12% van de gevallen ontbreekt een wisselend aantal ribben. Meestal is het ribkraakbeen abnormaal gebogen (KHERA et al., 1970).

4.1.4. Absorptie en exkretie

De systemische toxiciteit van de dipyridylumderivaten na orale toediening is afhankelijk van de absorptie vanuit de darminhoud (DANIEL & GAGE, 1966). In vergelijking met de parentale toxiciteit is de orale toxiciteit van diquat en paraquat veel geringer, waaruit SWAN (1966) besluit dat de absorptie doorheen de darmwand minimaal is. In tabel 1 geven CONNING et al. (1969) de absorptie van paraquat weer voor verschillende diersoorten. De absorptie is nooit groter dan 20% en is meestal zelfs veel lager. Paraquat kan in het bloed gedetekteerd worden kort na de orale inname er van. Er is een piekkoncentratie na 1 tot 6 uur. Ongeveer 90% van het geabsorbeerde paraquat wordt bij mammalia en mens reeds in de eerste 24 uur langs de urine uitgescheiden (DANIEL & GAGE, op.cit. ; HENSEL & DURR, 1971). Toch blijft het nog lange tijd in de urine te detekteren (SWAN, 1969 ; MURRAY & GIBSON, 1974). CONNING et al. (1969) achten het onwaarschijnlijk dat paraquat door een of ander weefsel selektief wordt geakkumuleerd. Zij noemen het een typisch "hit-and-run-poison" naar de bepaling van BARNES (1968), omdat : "the delayed toxic effects of paraquat occurring after the excretion of virtually all of the material have caused it to be classed as a "hit-and-run" compound that is a compound causing immediate damage, the consequences of which are not apparent until later". Deze hypotese werd op afdoende wijze weerlegd door SHARP et al. (1972) die goed detekteerbare concentraties paraquat en diquat konden waarnemen in verschillende weefsels van ratten zowel een lange als een korte termijn na een intraveneuze toediening (zie Figuur 6). Verder bewijzen de auteurs dat beide produkten preferentieel door bepaalde weefsels worden geakkumuleerd recht evenredig met de toxiciteit van het produkt voor deze weefsels (Tabel 2). Dit wordt ook op spektakulaire wijze gedemonstreerd door de autoradiografische experimenten van LITCHFIELD et al. (1973) : de distributie van

radioactief paraquat en diquat in het totale lichaam van een muis 10 min. na een intraveneuze inspuiting was : lever, intervertebraal en intersternaal kraakbeen, blaas en mucosa van de dunne darm ; ter hoogte van de lever akkumuleert paraquat preferentieel in het leverparenchym terwijl diquat bij voorkeur in de galblaas wordt opgehoopt. Na deze korte tijd (10 min.) werd nog maar weinig paraquat of diquat gevonden in de longen. Een specifieke akkumulatie van paraquat vond men in de hartspier, terwijl er kleine hoeveelheden diquat in het centraal zenuwstelsel werden weergevonden.

Eén uur na de toediening bleef de distributie van beide produkten kwasi gelijk ; de totale concentratie daalde en het gehalte in de blaas en het darmepiteel steeg, wat er op wijst dat er een snelle eliminatie (exkretie) van beide produkten was. Na 24 uur was de exkretie van diquat bijna compleet terwijl paraquat nog in belangrijke mate aanwezig was in de longen. Na 72 uur was dit niet meer het geval.

Uit analoge proeven waarbij paraquat en diquat in het voedsel werden toegediend bleek vanaf de start van de proef dat ratten paraquat eveneens voornamelijk akkumuleerden in de dikke darm en in de longen. Na 8 weken waren ekwivalente hoeveelheden paraquat in nieren en spieren geakkumuleerd. Diquat vertoonde pas na 8 weken belangrijke ophopingsverschijnselen ter hoogte van de dikke darm en de nieren. De longen concentreerden het diquat slechts weinig wat overeenstemt met de bevindingen van ROSE et al. (1974).

Algemeen gesproken is het opvallend dat paraquat en diquat uit alle weefsels worden geëlimineerd behalve uit een paar specifieke weefsels voor elk. Dit zijn voornamelijk de longen en het hart voor paraquat, en de nieren voor diquat, en dit zijn precies de plaatsen waar de voornaamste pathologische effecten worden waargenomen.

MURRAY & GIBSON (op.cit.) toonden aan, aan de hand van de langdurige exkretie van paraquat en de residubepalingen in diverse weefsels, dat paraquat een hoge retentietijd heeft in verschillende proefdieren en ook in de mens. Zij vonden geen metaboliëten van paraquat in de urine. DANIEL & GAGE (op.cit.)

echter, stellen dat intestinale bacteriën 30% van het toegediende paraquat kunnen metaboliseren maar dat de metaboliëten niet door de darmmucosa worden geabsorbeerd. Uit het onderzoek van HEMINGWAY et al. (1975) blijkt dat bijna de volledige hoeveelheid van het radioactief paraquat via een fistula in het rumen van een schaap toegediend, langs de faeces wordt geëlimineerd en slechts een paar procent ervan langs de urine wordt uitgescheiden. In beide uitscheidingsprodukten werd de originele paraquat-struktuur voor 97% teruggevonden, voor het overige percentage werden de 4 fotodegradatie- en oxidatieprodukten van paraquat teruggevonden zoals beschreven door FUNDERBURK & BOZARTH (1967) (zie 4.1.6.).

Voor een koe werd 95.6% van het radioactief paraquat uitgescheiden langs de faeces, 0.7% langs de urine en 0.0032% was aanwezig in de melk. In de faeces bestond het radioactief materiaal voor 97% uit paraquat, in de urine werd aanvankelijk voor 90% paraquat aangetroffen en na 5 dagen nog slechts 65% paraquat. De rest van de radioactieve stoffen waren de voornoemde oxidatieprodukten van paraquat. Slechts 35 tot 50% van de minimale hoeveelheid radioactief materiaal in de melk aanwezig, kon als paraquat of een van zijn oxidatieprodukten worden herkend. Deze derivaten kwamen in gelijke of hogere concentraties voor dan het paraquat, doch alle componenten kwamen maximaal in een dosis van 0.001 mg/g (= 1 ppb) voor.

In hun proeven met kippen stelden LEAHEY & HEMINGWAY (1975) analoge processen vast met diquat : 98.5% van het radioactief diquat werd binnen 3 dagen in de faeces teruggevonden, waarvan 90% in de eerste 24 uur ; 75 à 80% van het radioactief materiaal in de faeces was diquat. Daarnaast werden 2 metaboliëten geïdentificeerd die overeen kwamen met respectievelijk 4 en 2% van de oorspronkelijke dosis radioactief diquat. Beide metaboliëten waren oxidatieprodukten van diquat (zie 4.1.6.).

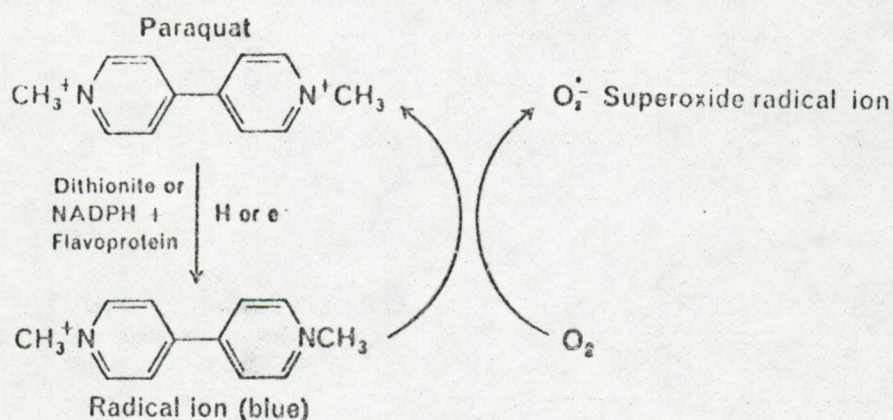
De eieren bevatten 0.053% à 0.029% diquat, voornamelijk in de dooier : dit komt overeen met 0.00012 mg/g in het eiwit en 0.003 mg/g in de dooier. Bijna alle radioaktiviteit in de eieren kon worden geïdentificeerd als diquat of één van de

twee metaboliëten. Eén van de oxidatieprodukten kwam in een veel grotere mate voor dan het diquat.

4.1.5. Biochemisch effect in dierlijke organismen

Bij gebrek aan afdoende bewijzen, heeft men nochtans, op het huidige ogenblik vele argumenten om aan te nemen dat voor mammalia, zoals voor planten, de toxiciteit van de dipyridylumderivaten berust op hun eigenschap gereduceerd en nadien geoxideerd te kunnen worden, gepaard met het ontstaan van vrije radicalen : "The property these compounds have of undergoing cyclic reduction and oxidation might suggest that they could interfere in electron-transport processes, diverting electrons from the system and reducing oxygen to water" (CONNING et al., 1969).

Paraquat neemt deel aan de elektronen-transfer-reakties waarbij het een substraat oxideert door elektronen ervan op te nemen en waarbij het daarna zelf wordt gereoxideerd door moleculaire zuurstof waaraan het zijn elektronen afstaat (CONNING et al., op.cit.). Als substraat benut paraquat het gereduceerd nicotinamide adenine dinucleotide fosfaat (NADPH). Deze oxidatie wordt gevolgd door een spontane reaktie van het gereduceerde paraquat met zuurstof waardoor het superoxideradikaal O_2^- en het oorspronkelijk paraquat-ion wordt geproduceerd (GAGE, 1968). Dit wordt schematisch weergegeven in figuur 7 uit de review van FLETCHER (1974).



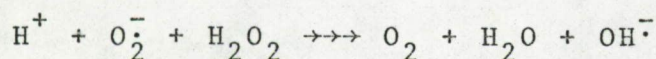
Figuur 7 : Reduktie en reoxidatie van paraquat
(naar FLETCHER, 1974).

Deze hypotese voor het werkingsmechanisme van paraquat wordt niet door iedereen als dusdanig aanvaard. Een gunstig argument werd geleverd door GIBSON (1975) die aantoonde dat deze "NADPH linked oxidation" van paraquat "in vitro" wordt geblokkeerd door het toedienen van "NADPH cytochrome c reductase antibody". In anaerobe kondities kunnen longmicrosomen van een muis paraquat eveneens tot het radikaal reduceren ; ook deze reactie wordt door het "cytochrome c reductase antibody" geblokkeerd. Dergelijke experimenten tonen echter alleen de capaciteit van dierlijke weefsels aan om paraquat te reduceren en reoxideren maar duiden het toxisch element niet aan.

ILETT et al. (1974) daarentegen uiten de hypotese dat het aangetroffen H_2O_2 het reductieproduct zou zijn van de reoxidatie van paraquat-radikaal in aanwezigheid van moleculaire zuurstof. "In vitro"-proeven met longmicrosomen van ratten en konijnen toonden immers een verhoogde produktie van H_2O_2 aan maar alleen in de hoogste uitgeteste concentraties paraquat ($10^{-4}M$).

GAGE (op.cit.) suggereerde echter reeds vroeger dat er vrije radicalen worden geproduceerd gedurende het reoxidatieproces, die een peroxidatie van de lipiden en dientengevolge weefselbeschadiging veroorzaken. ILETT et al. (op.cit.) gaan hier niet mee akkoord en toonden aan, aan de hand van proeven met longmicrosomen van de rat dat paraquat de vorming van malonaldehyde (produkt van de peroxidatie van de lipiden) inhibeert vanaf concentraties hoger dan $10^{-3}M$. Doch "Pulse radiolysis"-experimenten gaven reeds eerder het duidelijk bewijs dat het gereduceerd paraquat met zuurstof reageert waarbij transfer van één elektron optreedt waardoor het superoxide radikaal ontstaat (KNOWLES et al., 1969 ; FARRINGTON et al., 1973). De inhibitie door superoxide dismutase van de door paraquat geïnduceerde lipiden peroxidatie levert een bijkomend argument om aan te nemen dat de superoxide-produktie door paraquat wordt gestimuleerd (BUS et al., 1974 ; GIBSON, op.cit. ; AUTOR, 1974).

Het O_2^- radikaal en H_2O_2 zijn normale produkten in biologische processen en respektievelijk de enzymen superoxide dismutase en katalase katalyseren specifiek hun vlugge afbraak (McCORD & FRIDOVICH, 1969). FEE & TEITELBAUM (1972) schrijven de waargenomen hemolyse van rat-erythrocyten onder invloed van paraquat toe aan een peroxidatie van de membraanlipiden. Het feit dat zowel katalase als superoxide dismutase, de hemolyse en de lipiden peroxidatie inhiberen, suggereert dat respektievelijk H_2O_2 en O_2^- in het proces betrokken zijn. In dit verband achten de auteurs het mogelijk dat O_2^- en H_2O_2 samen reageren en ontstaan geven aan het eigenlijk reaktief fragment (zoals bvb. hydroxylradikaal), dat verantwoordelijk is voor het waargenomen effect.



Omdat katalase naast het peroxide ook het hydroxylradikaal afbreekt is het mogelijk dat katalase alleen reeds een grote bescherming biedt tegen hemolyse. Doch uit de experimenten van voornoemde auteurs blijkt ook duidelijk dat de "intermediaire komponent", met name het superoxide radikaal, tevens rechtstreeks betrokken is in de hemolyse, en dit via het algemeen fenomeen van lipiden peroxidatie.

Gezien de zeer korte halfwaarde tijd van het superoxide radikaal (FARRINGTON et al., op.cit.) ageert het in zeer lage concentraties en dichtbij de plaats waar het geproduceerd wordt (FLETCHER, op.cit.). Volgens BUS et al. (1974) reageert het peroxide-radikaal niet rechtstreeks met de onverzadigde vetzuren, maar wordt het eerst op niet enzymatische wijze omgezet tot singlet O_2 . Dit laatste produkt zou aanleiding geven tot de vetzuur hydroperoxides.

De toxiciteit van paraquat zowel voor planten als voor zoogdieren hangt af van de concentratie van de aanwezige zuurstof (MEES, 1960). De omvang van de univalente reductie van moleculaire zuurstof tot het superoxide-radikaal in aanwezigheid van paraquat is behalve van de hoeveelheid voorhanden moleculaire zuurstof ook funktie van de pH van het medium (MISRA & FRIDOVICH, 1971).

Zolang er voldoende zuurstof aanwezig is wordt het gereduceerde paraquat-radikaal terug omgezet in het paraquat-ion, met

gelijktijdige vorming van O_2^- . Bij limiterende O_2 -koncentraties worden in funktie van de tijd stijgende paraquat-radikaal konzentraties aangetroffen. BALDWIN et al. (1975) onderscheiden in dit proces drie fasen :

- 1) Een fase waarbij nog geen dipyridylum-radikalen worden opgehoopt omdat er nog voldoende O_2 aanwezig is voor de reoxidatie.
- 2) Een fase waarbij de dipyridylum-radikaalkoncentratie geleidelijk stijgt en waarbij alle O_2 die aan de haem-groep gebonden is wordt opgebruikt.
- 3) Een fase waarbij de dipyridylum-radikaalkoncentratie niet meer stijgt, omdat het milieu volledig anaeroob geworden is.

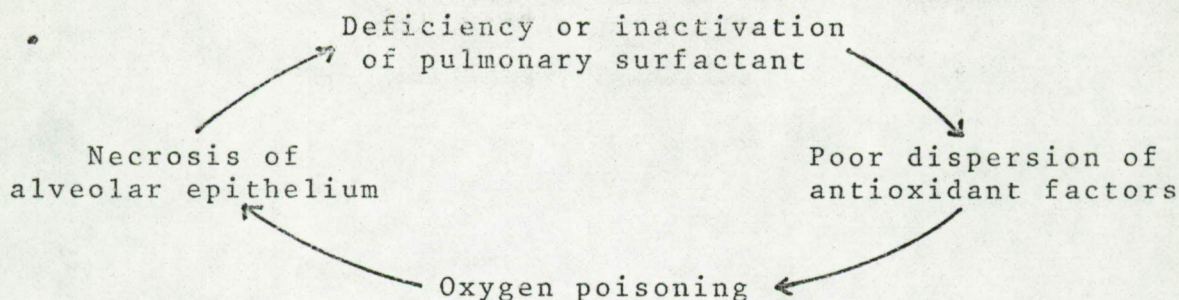
De hypotese in verband met het mechanisme gedurende fase 2 werd bewezen aan de hand van proeven waarbij O_2 door CO werd vervangen op de bindingsplaatsen van de haem-groep. In dit geval is er geen fase 2 te onderscheiden. Zolang het zuurstofpeil in het organisme (met inbegrip van haem-gebonden O_2) hoog is, treedt reoxidatie van het dipyridylum-radikaal op met vorming van het toxische superoxide-radikaal en waterstofperoxide. Uit een reeks "in vivo"-proeven met ratten, guinese biggen en konijnen en een paar verslagen over vergiftigingsgevallen bij de mens, konkluderen FISHER et al. (1973) het volgende : "In the present study, rats exposed to both paraquat and oxygen died sooner than expected from either agent alone. In the absence of evidence to the contrary, it is believed prudent for clinicians to assume that patients intoxicated with paraquat are unusually susceptible to pulmonary oxygen toxicity. This assumption dictates that oxygen enrichment of the inspired gas for treatment of hypoxemia be restricted, in these cases especially, to the minimum consistent with adequate oxygenation, and that the duration of exposure be as brief as possible".

MANKTELOW (1967) introduceerde aan de hand van zijn experiment met muizen de hypotese dat paraquat specifiek interfereerde met de vorming van een tensioactieve stof noodzakelijk voor het behouden van de lage oppervlaktespanning van de long-alveolen. Dit pathogeen mechanisme van paraquat maakt van dit produkt een geschikt experimenteel model voor het bestu-

deren van het "idiopathic respiratory distress syndrome" (IRDS), van pasgeborenen, dat te wijten is aan een deficiëntie van het long-surfactant.

Dit tensioactief bevat hoofdzakelijk dipalmitoyl lecithine, hetgeen FLETCHER & WYATT (1970, 1972) er toe leidde het effect van paraquat op het lipiden-metabolisme en de lipiden-samenstelling van de longen van ratten te onderzoeken. Zes dagen na de behandeling met paraquat, kon een sterke verhoging van het arachidonzuurgehalte en een zwakke verhoging van de cholesterol-esterfractie worden waargenomen. De hoeveelheid dipalmitoyl lecithine werd echter niet beïnvloed. Het fosfolipidenmetabolisme is volgens deze auteurs gevrijwaard voor peroxidatie. Dus het vooropgestelde werkingsmechanisme is hier volgens deze auteurs niet van toepassing.

Daarentegen vond ROBERTSON (1973), met gevoeliger technieken, een daling van 50% in de concentratie van dipalmitoyl lecithine. Deze reductie kan volgens hem te wijten zijn aan inaktivatie, eliminatie of geïnhibeerde syntese van het tensioactief. De auteur neemt aan dat er zeker een inaktivatie of een eliminatie van het tensioactief optreedt omdat het effect van paraquat op de hoeveelheid surfactant slechts na 18-24 uur voelbaar zou zijn indien het alleen zou te wijten zijn aan een verminderde syntese. Dit laatste is niet het geval. Anderzijds veroorzaakt de necrosis van het alveolair epiteel een geïnhibeerde syntese van fosfolipiden en bijgevolg van het surfactant. De auteur geeft echter geen verklaring voor het mechanisme van de inaktivatie van het dipalmitoyl lecithine, zodat de hypothese van peroxidatie van dit fosfolipide niet uitgesloten is. Voornoemde auteur geeft anderzijds een interessante theorie : dit is een "viciëuse cirkel" die kan in gang gestoken worden, zowel door een zuurstof- of paraquat-intoxicatie als door een deficiëntie van het longtensioactief zoals in het geval van het hoger vermelde IRDS (Figuur 8).



Figuur 8 : Viciëuse cirkel tussen een zuurstof of paraquatvergiftiging en een de deficiëntie van het longtensioaktief (naar MANKTELOW, 1967)

Als konklusie van dit literatuuroverzicht blijkt dat het gedetailleerde mechanisme van de toxiciteit voor mammalia van de dipyridyliumderivaten paraquat en diquat nog steeds niet werd achterhaald. Het voorgestelde mechanisme dat de meeste aanhangers telt is dit volledig overeenkomstig met de werking in planten : hierbij wordt het dipyridylium-kation gereduceerd tot het radikaal, gevolgd door een reoxidatie tot het oorspronkelijk tweewaardig kation met terzelfdertijd een éénwaardige reductie van een molekule zuurstof tot het superoxide-radikaal O_2^- . Dit superoxide kan al dan niet via vorming van singlet, reageren met fosfolipiden of onverzadigde vetzuren, met het afsterven van de cel voor gevolg. Het aandeel in het toxisch effect van het gevormde H_2O_2 of eventueel het OH^- (hydroxyl-radikaal) is voorlopig nog niet bekend.

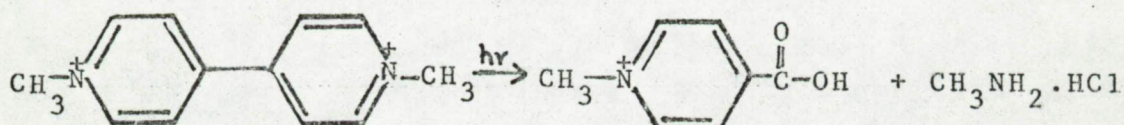
Aangenomen dat het gehalte aan dipalmitoyl lecithine in het longtensioaktief wel degelijk daalt, is het voorgestelde werkingsmechanisme van paraquat niet onverenigbaar met de waargenomen surfactant-deficiëntie.

Gezien de zeer korte halfwaardetijd van het superoxide-radikaal (FARRINGTON et al., op.cit.) ageert het in zeer lage concentraties en dichtbij de plaats waar het geproduceerd wordt.

4.1.6. Chemische afbraak en biodegradatie

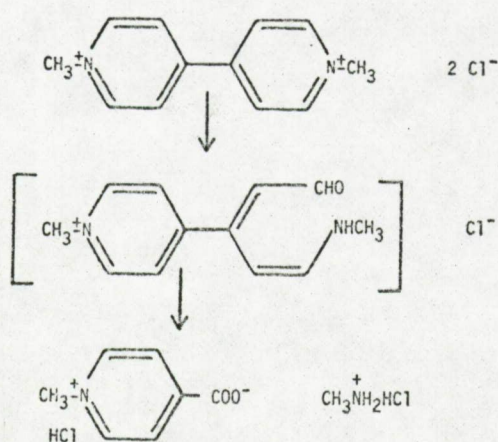
Niettegenstaande er weinig specifiek onderzoek naar de afbraak van dipyridyliumderivaten werd verricht, neemt men aan dat hogere planten deze herbiciden niet kunnen afbreken (FUNDERBURK & LAWRENCE, 1964 ; CALDERBANK & SLADE, 1966 ; KLEIN, 1972). De enige

waargenomen afbraak is te wijten aan een fotodegradatie bij U.V.-licht. Bij paraquat treedt fotodegradatie door het zonlicht alleen op indien het aan een oppervlak is geadsorbeerd, omdat het paraquat in waterige oplossing een absorptiepiek voor U.V.-licht vertoont bij 257 nm, terwijl de onderste grens van het zonlicht bij 290 nm ligt. Geadsorbeerd ligt de piek van paraquat daarentegen bij 275 nm, maar is breder uitgespreid zodat nog voldoende zonlicht wordt geabsorbeerd (SLADE, 1966). Zowel in vitro als in vivo zijn de fotodegradatieprodukten van paraquat (Figuur 9) :



Figuur 9 : Fotodegradatieprodukten van paraquat (naar SLADE, 1965).

Met dunnelaagchromatografie toonde SLADE (1965) aan dat er minstens zes afbraakcomponenten kunnen onderscheiden worden, waaronder (Figuur 10) :



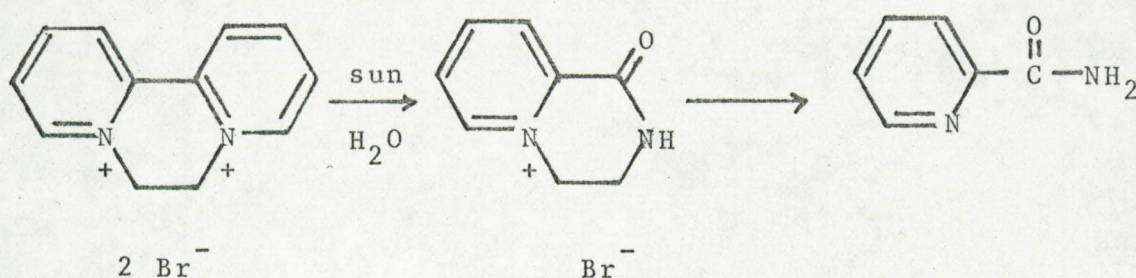
Figuur 10 : Vooropgesteld afbraakproces van paraquat onder invloed van ultraviolet licht (naar SLADE, 1965).

De degradatie start onmiddellijk na het begin van de bestraling met UV-licht, en na 3 dagen is er in de oorspronkelijk 1000 ppm paraquatoplossing geen spoor van paraquat meer te vinden.

Ook diquat wordt door het zonlicht snel afgebroken. Na 192 uur (8 dagen) is er in de waterige oplossing geen diquat meer te bespeuren (FUNDERBURK & BOZARTH, 1967).

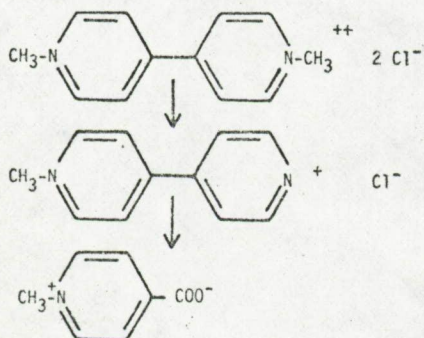
In tegenstelling met paraquat is het voor de fotodegradatie van diquat onder invloed van het zonlicht niet noodzakelijk dat aan een substraat geadsorbeerd.

ROSEN (1972) stelt het afbraakmechanisme van diquat als volgt voor :



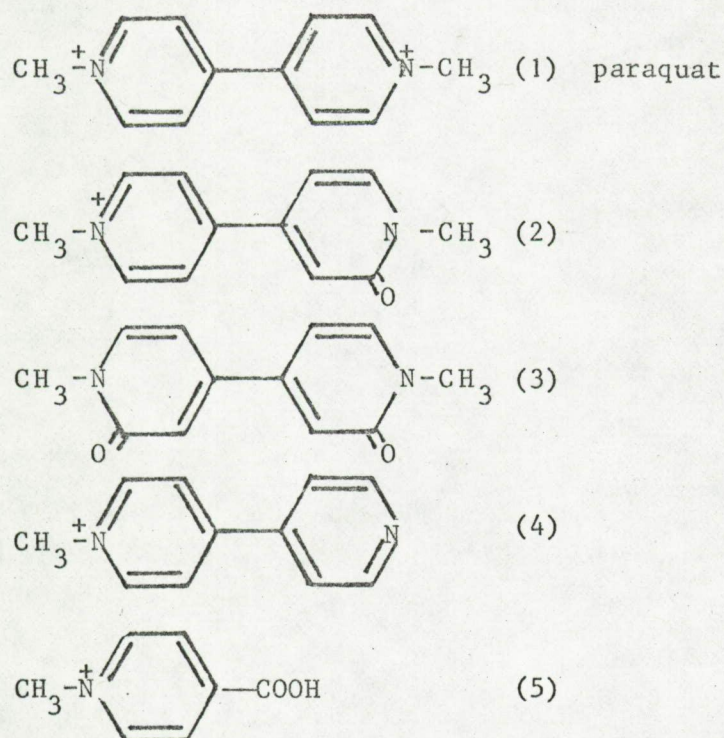
Figuur 11 : Vooropgesteld fotodegradatieproces van diquat (naar ROSEN, 1972).

In een biologisch systeem kunnen de dipyridylumherbiciden paraquat en diquat, die zeer sterk aan de bodempartikels worden geadsorbeerd (zie 7.2.2.), door bodemmikroörganismen worden gemetaboliseerd. Als mechanisme voor deze bacteriële afbraak van paraquat stellen FUNDERBURK & BOZARTH (1967) volgende reacties voor :



Figuur 12 : Vooropgesteld bacterieel afbraakproces van paraquat (naar FUNDERBURK & BOZARTH, 1967).

Deze afbraak gebeurde in een oplossing van 1000 ppm, in 4 dagen tijd, met een onbekende samenstelling van paraquat-resistente bacteriën. In mammalia (schaap, koe) werd ook een gering metabolisme van paraquat vastgesteld, ter hoogte van het gastro-intestinaal systeem, ofwel zelfs na absorptie in het bloed. Ook in koemelk werden metaboliëten van het paraquat teruggevonden (HEMINGWAY et al., 1975). De metaboliëten werden geïdentificeerd als de normale fotodegradatie- en oxidatieprodukten van paraquat (Figuur 13) :



Figuur 13 : Metaboliëten van paraquat teruggevonden in mammalia (naar HEMINGWAY, LEAHEY, DAVIS & GRIGGS, 1975).

In de faeces en urine van een schaap (na toedienen van 233 mg/kg paraquat-ion via rumen-fistula) werden de metaboliëten (2) tot (5) teruggevonden, met overmaat van produkt (2). 97% van de totale radioaktiviteit van faeces en urine was echter nog steeds afkomstig van het niet gedegradeerde paraquat. In de urine van een koe werd 1 en 3 dagen na de behandeling (oraal : 11.4 mg/kg paraquat-ion) hoofdzakelijk produkt (2) teruggevonden en op de tweede plaats produkt (4). Na 5 dagen werd er drie maal meer (4) gevonden dan (2) (Tabel 3).

Tabel 3 : Percentages paraquat en zijn metaboliëten teruggevonden in de urine van koeien (naar HEMINGWAY et al., 1975).

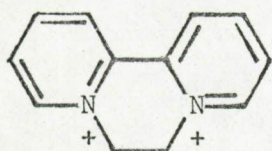
Compound	Day		
	1	3	5
% Paraquat	90	70	65
% Compound 2	7	12	8
% Compound 4	4	6	25

In de melk werd vanaf de eerste dag één tot drie maal meer (4) gedetekteerd dan (2). Samen met paraquat maken deze componenten slechts 35-50% van de totale radioactiviteit in de melk uit (Tabel 4). De rest kon niet geïdentificeerd worden.

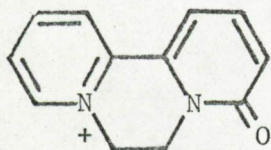
Tabel 4 : Percentages paraquat en zijn metaboliëten teruggevonden in koemelk (naar HEMINGWAY et al., 1975).

Compound	Day		
	1	2	3
% Paraquat	15	8	9
% Compound 2	3	18	10
% Compound 4	15	18	25

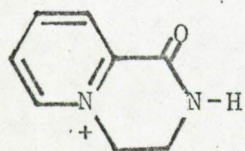
Diquat wordt eveneens gedeeltelijk gemetaboliseerd op biologische wijze. In de faeces van kippen (na orale toediening van 4-5 µg/g/dag diquat-ion) identificeerden LEAHEY & HEMINGWAY (1975) twee metaboliëten, nl. (2) en (3) (Figuur 14) :



(1) diquat



(2)



(3)

Figuur 14 : Metaboliëten van diquat teruggevonden in kippen (naar LEAHEY & HEMINGWAY, 1975).

Slechts + 75% van de radioactiviteit was toe te schrijven aan diquat. Na 5 dagen was er 4% toe te schrijven aan metaboliet (2) en 2% aan metaboliet (3). De overige radioactieve elementen konden nog niet gescheiden en bepaald worden.

In de eierdooier werd 37% van de radioactiviteit toegeschreven aan diquat (1), 58% aan komponent (2) en 5% aan komponent (3). Na een langere periode (14 dagen) met een lagere dosis (0.4-0.5 µg/g/dag) was dit respectievelijk 86%, 85% en 10%.

Experimenteel kunnen paraquat en diquat in een paar dagen volledig worden afgebroken door een optimale expositie aan U.V.-licht (onder niet geadsorbeerde vorm), en door een optimale toediening van resistente bacteriën. Uit veldonderzoek is echter reeds dikwijls gebleken dat de dipyridylumderivaten door hun hoge adsorptieaffiniteit voor de sedimenten (zie 7.2.2.) niet toegankelijk zijn voor beide degradatiemechanismen. In hogere organismen worden beide herbiciden vrijwel onmiddellijk en voor de overgrote meerderheid in onveranderde vorm uitgescheiden. Enkele oxidatieprodukten van paraquat en diquat werden als metabolieten geïdentificeerd. Alleen in de melk van de testkoe en eieren van de testkippen komen deze metabolieten t.o.v. de uitgangsprodukten paraquat en diquat, in een relatief belangrijke dosis voor. Doch in verhouding met de oorspronkelijk toegediende dosissen zijn deze residus te verwaarlozen. Paraquat en diquat kunnen dan ook terecht persisterende herbiciden genoemd worden.

Waar deze persistentie wenselijk kan zijn voor een verlengde herbicide werking, is ze terzelfdertijd schadelijk, wanneer men ze beschouwt in een meer milieubeschermende kontekst. In het geval van paraquat en diquat kan deze persistentie geen enkel voordeel hebben omdat eens deze produkten aan de bodempartikels geadsorbeerd, ze alle herbicide aktiviteit verliezen.

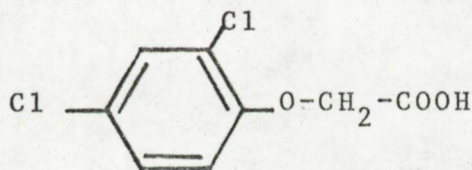
Een redelijke biodegradatie is bijgevolg te verkiezen ten einde het risico van bioakkumulatie tot een minimum te herleiden, op voorwaarde echter dat er geen toxische en nog meer resistente en persisterende afbraakprodukten worden gevormd. MATSUMARA (1973) drukt dit terecht uit als volgt :

"It is important to remember that, for these pesticides degradation of the original compounds does not always mean an immediate elimination of the hazard. On the contrary, it is often one finds that an equally or more toxic metabolic product appears after the original compounds have disappeared. Many of the conversion products are stable and cause just as many residual problems as the original compounds".

4.2. 2,4-D (2,4-dichloorfenoxazijnzuur)

4.2.1. Fysische eigenschappen

Het 2,4-D is een wit poeder met molekulair gewicht van 221.05. Het smeltpunt ligt bij 140.5°C en de oplosbaarheid in water bij 25°C is 620 ppm. Het is niet hygroscopisch maar korrosief. Het smeltpunt van het triethanolamine ligt tussen 142 en 144°C, de oplosbaarheid in water bij 30°C-32°C bedraagt 440 g/100 g. De structuurformule is weergegeven in Figuur 15:



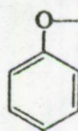
2,4-dichloorfenoxazijnzuur

Figuur 15 : Structuurformule van 2,4-D (vrij zuur).

Vanaf het verschijnen op de markt van 2,4-D in 1942 (ZIMMERMAN & HITCHCOCK, 1942) werd een studie gemaakt over de formulering van het herbicide. Samen met de optimale gebruiks-dosis bepaalt dit het succes van de translokatie en bijgevolg van de herbicide werking ; de omzetting naar het vrije zuur is echter noodzakelijk voor een effectieve fytotoxische activiteit.

Een reeks van de meest gebruikte derivaten wordt gegeven door ASHTON & CRAFTS (1973) (Tabel 5).

To indicate the nature of the formulation problem let us designate the



phenoxy group as R. Then examples of the various salts and esters are as follows:

Salts

Sodium salt, $R-CH_2COONa$
 Potassium salt, $R-CH_2COOK$
 Ammonium salt, $R-CH_2COONH_4$
 Triethylamine salt, $R-CH_2COONH(C_2H_5)_3$
 Triethanolamine salt, $R-CH_2COONH(C_2H_4OH)_3$

Alkyl Esters

Methyl ester, $R-CH_2COOCH_3$

Isopropyl ester, $R-CH_2COOC$

Butyl ester, $R-CH_2COOC_4H_9$

Octyl ester, $R-CH_2COOC_8H_{17}$

Heavy or Low Volatile Esters

Butoxyethanol ester, $R-CH_2COOC_2H_4-O-C_4H_9$

Propyleneglycolbutylether ester, $R-CH_2COOCH_2CH(OH)CH_2O-C_4H_9$

Tetrahydrofurfuryl ester, $R-CH_2COO$

Tabel 5 : Lijst van de meest gebruikte 2,4-D-derivaten
 (naar ASHTON & CRAFTS, 1973).

De esters zijn zeer vluchtig, dit in tegenstelling met de aminezouten waarvan de vluchtigheid daalt naarmate de keten langer is. In 48 uur verdampt maximaal 10% van het 2,4-D uit het water in de lucht (QUEHEL & SUTHERLAND, 1974).

4.2.2. Werking in planten

De gechloreerde fenoxazijnzuurverbindingen zijn een reeks fytotoxische produkten die als herbicide worden gebruikt onder de vorm van het vrije zuur, als zouten, aminezouten en esters.

De chlorofenoxazijnzuurderivaten zijn groeiregulators of "auxinen" met hormoonaktiviteit ; bij lage dosissen beïnvloeden ze de groei van de plant op een andere plaats dan deze waar het produkt werd toegediend. Deze translokatie-eigenschap geeft aan deze herbiciden het voordeel dat ze in kleine dosissen kunnen ^{worden} aangewend en gebruikt voor het doden van een wortelsysteem door een behandeling van de bladeren.

De chlorofenoxy herbiciden doen het groeipatroon van de planten snel veranderen : de meristematische cellen houden op met delen ; de lengtegroei cellen groeien niet meer in de lengte maar versnellen integendeel hun groei in de breedte. De parenchymcellen zwellen en beginnen veelvuldig te delen. Phloem en xyleem worden toegesnoerd met als gevolg blokkering van het transport van voedsel, water, mineralen en andere essentiële stoffen.

De wortels van de plant verliezen hun vermogen water te absorberen, er is geen expansie meer van de bladeren, de fotosynthese wordt geremd, met als uiteindelijk gevolg het afsterven van de plant.

Het soort effect van 2,4-D is sterk afhankelijk van de toegediende dosis. In lage concentraties wordt de lengtegroei gestimuleerd. In hogere concentraties worden de meristemen geïnhibeerd, stopt de lengtegroei en veroorzaakt de laterale expansie, gezwollen op de stam en de wortels. Bij nog hogere concentraties kunnen de plaatsen van kontakt met het herbicide (meestal de bladeren) reeds zodanig worden aangestast dat er geen translokatie meer plaatsvindt (ASHTON & CRAFTS, 1973). Citeren we verder STRIJCKERS (1970) :

"Een meer algemene interpretatie van de groeistofwerking slaat op een reactie met een substraat. Thans neemt men aan dat deze herbiciden meer werken als ontregelaars van enzymensystemen. De voornaamste fysiologische processen, zoals ademhaling, fotosynthese, groei e.a., bestaan uit een keten van reacties waarbij enzymen nodig zijn. Door remmen of stimuleren van deze enzymen wordt de normale ontwikkeling van de plant gestoord. Herhaaldelijk kon men aldus beïnvloeding van de ademhaling door herbicide groeistoffen aantonen terwijl anderzijds het vitaal belang van de ademhalingsenzymen door het leveren van de drijvende kracht voor cellulaire processen algemeen aangenomen is.

Beïnvloeding van de plantenstofwisseling o.m. van de ademhaling en vnl. wijziging van het N-gehalte, door syntetische groeistoffen, zoals 2,4-D, zou wijzen op storingen van de β -indolazijnzuur- (IAA-) en van de eiwitstofwisseling door een plasmagift. Als gevolg van zijn gelijkende moleculaire structuur zou 2,4-D in konkurrentie treden met het IAA en dit van zijn werkingsplaats verdringen ofwel het als bouwsteen voor bepaalde verbindingen vervangen ("anti-auxine"). Dit zou dan wellicht de invloed van 2,4-D op de ademhaling kunnen verklaren daar het IAA de rol vervult van katalysator van het met de groei gekoördineerde deel van de ademhaling".

Op cellulair vlak is gebleken dat 2,4-D het aantal ribosomen en het RNA-gehalte doet stijgen (WEST et al., 1960). Lage concentraties 2,4-D stimuleren de groei en de RNase-aktiviteit terwijl hoge, herbicide concentraties deze inhiberen. Door de RNase-aktiviteit te remmen stijgt (door een verminderde afbraak) de RNA-koncentratie in de cellen ; terzelfdertijd wordt ook de nukleïnezuursynthese gestimuleerd. De gevolgen hiervan zijn : een toename van de eiwitsynthese en celdeling, en een woekergroei die eindigt in het afsterven van de plant (KEY, 1963).

Het mechanisme van 2,4-D bestaat erin dat dit produkt werkt als een allosterische derepressor van het gen dat de syntese van RNase reguleert (MONOD et al., 1963). Deze allosterische derepressor wordt gevormd door het 2,4-D dat specifiek gebonden is aan een transfer-RNA-fraktie (ARMSTRONG, 1966).

Op die manier kan ook het ontstaan van eiwit-2,4-D-komplexen worden verklaard. Want, indien het met 2,4-D gebonden transfer-RNA zijn zelfde functie bewaart, wordt het 2,4-D in de eiwitsyntese ingeschakeld wat een voortijdige beëindiging van de opbouw van de ketting van aminozuren veroorzaakt (ASHTON & CRAFTS, op.cit.). Het ontstaan en de functie van de aminozuur-konjugaten en de recente hypotese van FEUNG et al. (1974) dat deze gekonjugeerde vorm van 2,4-D eigenlijk de fysiologisch aktieve vorm zou zijn, kunnen in deze kontekst niet verklaard worden.

Terwijl de veranderingen onder invloed van 2,4-D op mikrobiologisch vlak (stijging van het RNA- en eiwitgehalte, en ontstaan van bepaalde metabolieten) belangrijke aanduidingen zijn dat de celkern de primaire aktieplaats is van het herbicide, wijzen daarentegen de experimenten van NISSEL & ZENK (1969) er op dat er geen aanloopfase van het effect op de celgroei is, dus dat het effect onmiddellijk waarneembaar is. Dit betekent dat 2,4-D een aantal "inleidende" effecten heeft op bv. de osmotische eigenschappen van de cel, waardoor het celvolume kan toenemen nog voor er een stimulans van de eiwitsyntese is opgetreden.

De vorige beschouwingen kunnen we het best resumeren met het besluit van ASHTON & CRAFTS (op.cit.) :

"The mode of action of the chlorophenoxy compounds must consist of a great number of structural and biochemical reactions revolving around the central theme of prolonged abnormal growth with failure of those changes characteristic of maturity and senescence. In no other way may the great number and diversity of structural and metabolic changes be reconciled".

4.2.3. Dierlijke pathologie

De fenoxiazijnzuren veroorzaken een aantal afwijkingen bij dierlijke organismen. De voornaamste zijn het effect op de groeisnelheid, de overleving en het individueel gewicht van de organen (CHANG et al., 1974). Het gewicht van de lever van met 2,4-D behandelde ratten is steeds lager dan van

de controles. Er is een verhoogd RNA-gehalte maar geen proteïneconcentratie. Opvallend is het 50 tot 100% stijgen van het glycogeengehalte in de lever (CHANG et al., 1974). Er werden gastro-intestinale hemorrhagieën en abnormale hematologische parameters waargenomen.

Koeien (en vee in het algemeen) die 2,4-D hebben ingenomen vertonen tekenen van depressie, anorexie, rumen stasis en spierverswakking waardoor de dieren niet meer rechtop kunnen staan (McLENNAN, 1974).

Voor vogeleieren is 2,4-D niet alleen een embryocide doch heeft het ook teratogene eigenschappen (SOMERS et al. 1974). Bij kippen bleek het % uitkippen van de eieren niet verschillend tussen behandelde en niet behandelde eieren ; er werden geen abnormaliteiten waargenomen in de levende kuikens, maar wel in de dode embryos. De groei van de kuikens werd echter significant beïnvloed en de invloed was geslachtsgebonden : de mannelijke kuikens groeiden vlugger dan de blanco's, de vrouwelijke niet (SOMERS et al., op.cit.).

De teratogene eigenschappen van 2,4,5-T (een homoloog van 2,4-D) die reeds epidemiologisch in de kranten werden gesignaleerd (Standaard, 31 aug.-1 sept., 1974 ; Standaard, 3 sept., 1974) worden toegeschreven aan polygechloreerde dibenzo-p-dioxines, kontaminanten van commercieel bereide gechloreerde fenolen zoals 2,4,5-T (CONAWAY & MATSUMURA, 1975).

4.2.4. Absorptie en excretie

De absorptie van 2,4-D door dierlijke of plantaardige weefsels hangt af van zijn polaire eigenschappen.

CLARK et al. (1975) stelden vast dat formuleringen als esters, aminezouten en andere zouten steeds tot het vrije zuur worden omgezet alvorens opgenomen te worden.

Het vrije zuur wordt na de absorptie zeer vlug in onveranderde vorm geëxcreteerd. Na 72 uur wordt reeds 95% van de orale dosis toegediend aan ratten, in de urine weergevonden (KHANNA & FANG, 1966 ; WALKER, 1971).

Hetzelfde hoog procent wordt na 96 uur weergevonden in de urine van koeien t.o.v. 24% in de urine van schapen (CLARK et al., op.cit.). Na 72 uur is het herbicide in 3 soorten vis grotendeels uitgescheiden via de galblaas (RODGERS & STALLING, 1972). In overeenstemming met deze vlugge en hoge exkretie worden de hoogste residus 2,4-D in koeien en schapen aangetroffen in de nieren (respektievelijk 0.9-0.5% en 0.05%) (CLARK et al., op.cit.)

In vissen werden hoge residuwaarden in alle weefsels en organen gevonden na 1 à 2 uur voor gevoede vissen en na 1 à 8 uur voor niet gevoede vissen. De hoogste concentraties kwamen voor, in volgorde, ter hoogte van de galblaas, de nieren, de lever en het kieuwweefsel; lagere concentraties in het bloed, de hersenen, de spieren en de maag (RODGERS & STALLING, op.cit.). SCHULTZ (1973) rapporteert dat in de galblaas van Ictalurus punctatus ("catfish") na 1 week verblijf in een oplossing van 2 ppm herbicide, een residu van 17 mg/kg lichaamsge wicht 2,4-D gevonden wordt ; na 7 weken is ook in de lever en de nieren 1 mg/kg 2,4-D aanwezig. Lepomis macrochirus ("bluegill") akkumuleert nog meer herbicide, aangezien na 4 weken terug overgebracht te zijn in een vers medium zonder 2,4-D er in alle onderzochte organen en weefsels een hogere concentratie herbicide weer te vinden is dan de oorspronkelijk uitgeteste concentratie (zie Tabel 6).

Tabel 6 : Residu (mg/kg of mg/l) van DNA-¹⁴C-2,4-D in de weefsels van Ictalurus punctatus ("Channel catfish"), Micropterus salmoides ("Largemouth bass"= forellenbaars) en Lepomis macrochirus ("Bluegill") en in het water en de sedimenten van vijvers na een behandeling met 2.0 mg/l 2,4-D (naar SCHULTZ, 1973).

Sample	Weeks after treatment								
	1	7	12	1	7	12	1	7	12
Tissue ^b	Channel catfish			Largemouth bass			Bluegills		
Blood	0.10	38.74	29.95	0.13	1.06	6.02	0.67	8.57	68.05
Brain	0.17	58.63	27.25	0.12	3.63	5.12	0.27	37.39	98.63
Gill	0.16	45.32	28.06	0.14	2.20	6.27	0.45	35.47	71.51
Bile	106.49	10.97	5.04	5.68	3.47	1.35	17.34	12.28	24.75
Liver	0.77	48.31	22.17	0.30	3.40	7.29	2.62	32.12	61.78
A-kidney ^c	0.06	52.95	26.60						
P-kidney ^d	0.38	48.82	35.51	0.70	2.37	4.49	3.32	31.33	88.05
S-muscle ^e	0.06	7.33	5.63	0.08	0.22	1.32	0.13	4.16	39.59
L-muscle ^f	0.05	17.08	13.47	0.06	0.32	2.53	0.14	5.85	29.91
Storage fat				1.04	1.42	3.31			
Pyl-caeca ^g				0.32	4.29	7.14	2.80	84.94	322.74
Eggs					0.96	5.97	0.29 ^h		76.47 ^h
Testes				0.14 ^h		4.25		22.15	65.81 ^h
Water	1.68	0.02	<0.01	0.40	0.05	<0.01	0.50	<0.01	<0.01
Hydrosol	0.21	<0.01	0.02	0.10	<0.01	<0.01	0.08	0.06	<0.01

^a Water and hydrosol residues based on glc analyses. Tissue residues based on radiometric analyses. ^b Values are means of two fish. ^c Anterior kidney. ^d Posterior kidney. ^e Striated muscle. ^f Lateral line muscle. ^g Pyloric caeca. ^h Data from one fish only.

Dit wordt bevestigd door veldwaarnemingen van SCHULTZ & HARMAN (1974) en SCHULTZ & WHITNEY (1974) waaruit blijkt dat vissen het herbicide ver boven de concentratie van het omringend milieu kunnen concentreren ; in deze rapporten hebben de hoge residus echter enkel betrekking op analyses uitgevoerd een korte tijd na het toedienen van 2,4-D.

In vogels werd in de borstspier en in de lever 1 dag na besproeien van planten met 2,4-D, respectievelijk 0.30 en 0.675 mg/kg 2,4-D gedetekteerd, 4 dagen na het sproeien werd geen spoor van het herbicide meer teruggevonden (SCHULTZ & WHITNEY, op.cit.).

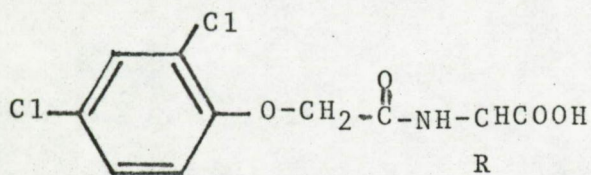
2,4-D wordt ook in belangrijke mate door de eierschaal (na uitwendig contact) geakkumuleerd. Slechts 0.1% hiervan komt in het embryo terecht (SOMERS et al., 1974).

4.2.5. Chemische afbraak en biodegradatie

2,4-D

De fenoxyzijnzuur herbiciden en in het bijzonder 2,4-D vertonen in planten een grote waaier van afbraakproducten. Reeds in 1952 identificeerden WEINTRAUB et al., (1952) het merendeel ervan.

In 1958 werden de eerste twee van een belangrijke reeks metabolieten gevonden, nl. de proteïne-komplexen (FANG, 1958) ; slechts tamelijk recent werden de aminozuur-konjugaten gedetekteerd (FEUNG et al., 1973a), met als algemene structuurformule (Figuur 16) :



Figuur 16 : Algemene structuurformule van de 2,4-D-aminozuurkonjugaten (naar FEUNG et al., 1973a).

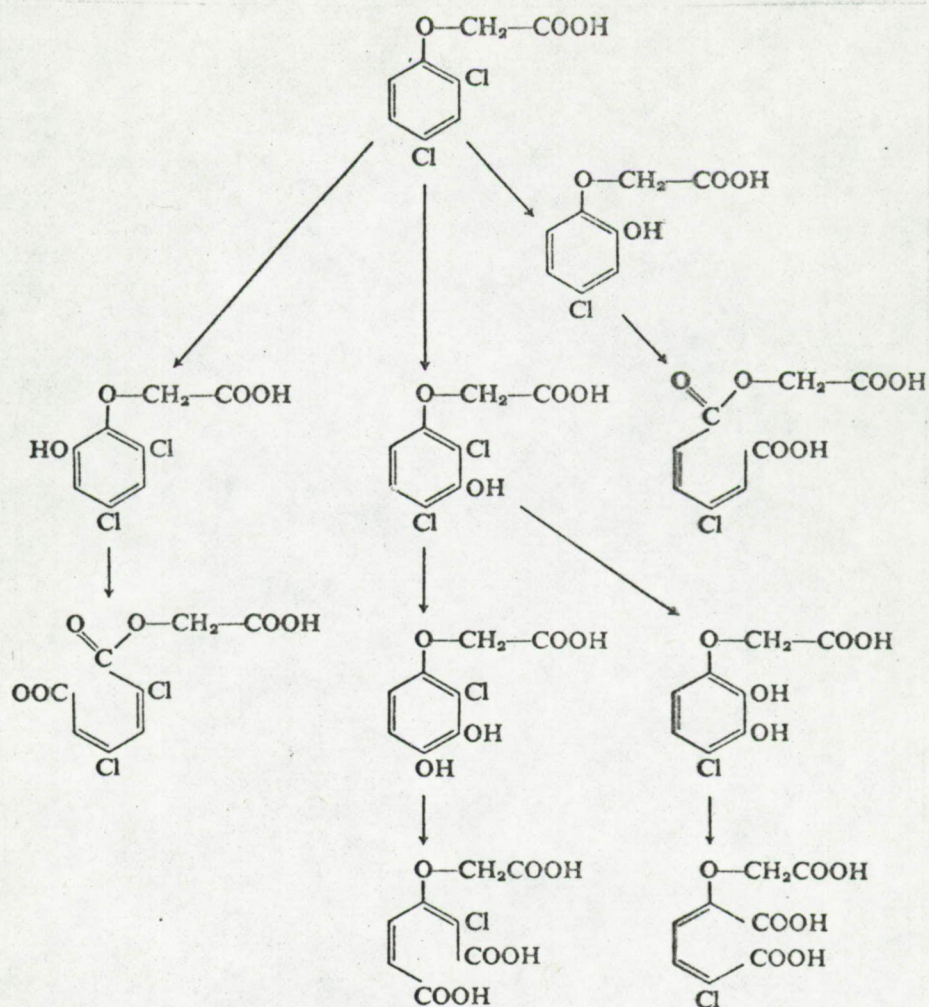
In vitro kunnen FEUNG et al. (1974) 20 verschillende konjugaten syntetiseren. Zeven van deze produkten werden reeds in vivo teruggevonden. Al deze produkten hebben bij een optimumkoncentratie groeistimulerende eigenschappen.

Voor sommige konjugaten is het groeistimulerend effect 50% groter dan dit van 2,4-D bij optimale concentratie. Bij hogere concentraties hebben alle konjugaten, zoals 2,4-D, herbicide eigenschappen.

De waargenomen omzetting van 2,4-D tot de 7 aminozuurkonjugaten is volgens FEUNG et al. (1974) waarschijnlijk geen detoxifikatieverschijnsel maar eerder een aktivatietrapp.

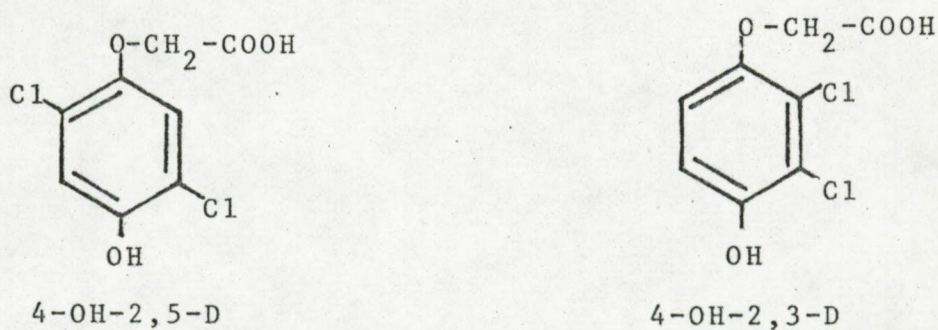
Het is nog een open vraag waar precies proteïne-komplexen en aminozuurkonjugaten te plaatsen in het afbraakproces van 2,4-D. Minder twijfel bestaat omtrent de gedecarboxyleerde metabolieten. LUCKWILL & LLOYD-JONES (1960) bewezen dat de herbicide werking van 2,4-D sterk gekorreleerd is met het vermogen van de plant om de carboxyl-groep en de methyleenkoolstoffen te oxideren met decarboxilatie voor gevolg.

BACH (1961) meent dat de afbraak van 2,4-D niet zo zeer gebeurt via een splitsing van de fenol-ether-binding maar door een hydroxylatie van de ring gevolgd door een oxidatie van deze hydroxyls tot carboxyls en tenslotte een doorbreken van de ring (zie Figuur 17).



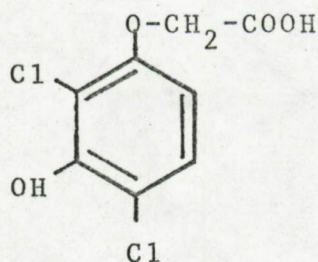
Figuur 17 : Vooropgesteld afbraakmechanisme van 2,4-D in hogere planten (naar BACH, 1961).

Deze gehydroxyleerde afbraakprodukten van 2,4-D werden door meerdere onderzoekers in hogere planten weergevonden (FLEEKER & STEEN, 1971 ; KLEIN, 1972 ; FEUNG et al., 1973b). Deze laatste auteurs vonden echter in het callusweefsel van soya twee metabolieten die in het schema van BACH (op.cit.) niet werden vermeld :



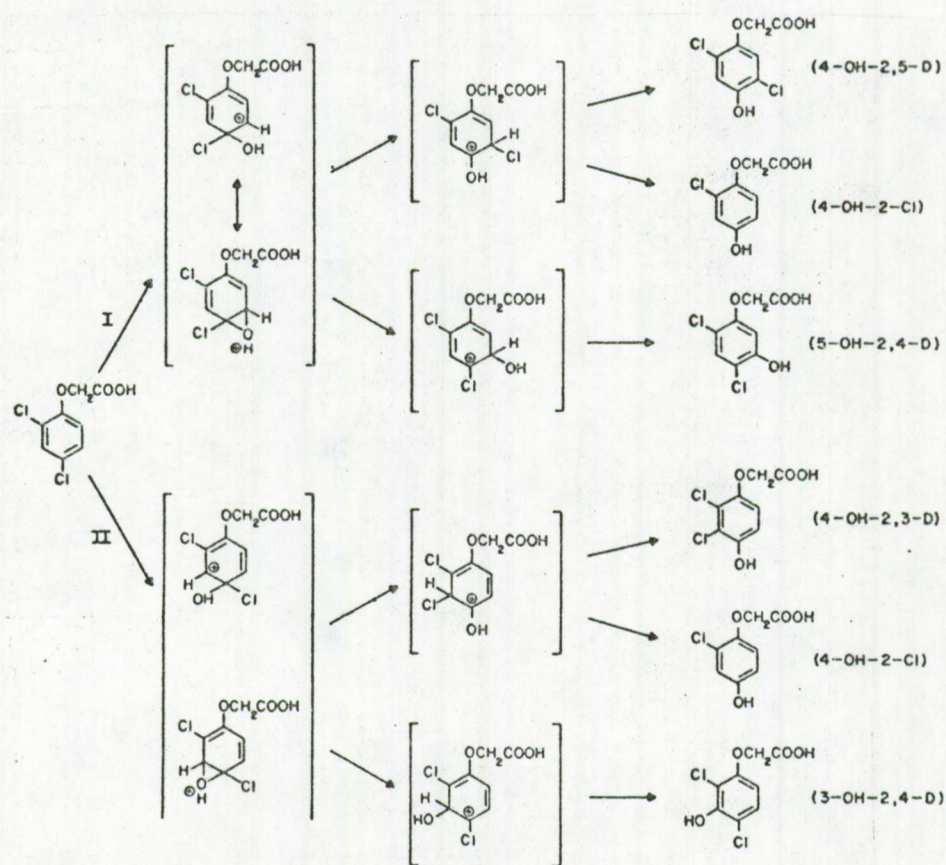
Figuur 18 : Twee gehydroxyleerde afbraakprodukten van 2,4-D met het callusweefsel van soya (naar FEUNG et al., 1973b).

FEUNG et al. (1973b) toonden naast deze gehydroxyleerde metaboliëten ook een belangrijke decarboxylatie aan. Bovendien vonden ze 7 konjugaten met aminozuren. De hydroxylatie en de konjugatie met aminozuren sluiten dus elkaar niet uit. Gezien na twaalf dagen inkubatie van de soyascheuten nog slechts hoofdzakelijk 4-OH-2,5-D en 4-OH-2,3-D werden teruggevonden, brengen deze auteurs de hypotese naar voor dat de aminozuurkonjugaten een geschikt substraat kunnen zijn voor een substraat-specifiek hydroxylatie-enzym. Vandaar dat sommige konjugaten worden afgebroken en andere geakkumuleerd. FEUNG en medewerkers deden de proeven over met andere plantensoorten en beweren in een recente publikatie "it seems quite likely that callus tissue, regardless of the species of plant, possesses common metabolic pathways" (FEUNG et al., 1975). In één van de onderzochte soorten vonden deze auteurs een derde gehydroxyleerde metaboliët nl. 3-OH-2,4-D, met als structuurformule :



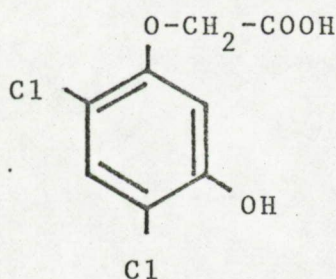
Figuur 19 : Gehydroxyleerd afbraakprodukt van 2,4-D uit het callusweefsel van koren (naar FEUNG et al., 1975).

De zes theoretische gehydroxyleerde derivaten van 2,4-D zijn in Figuur 20 weergegeven :



Figuur 20 : Vooropgesteld mechanisme voor de biologische hydroxylatie van de aromatische ring van 2,4-D.

Dit 3-OH-2,4-D werd door VALENTINE & BINGHAM (1974) ook teruggevonden in het extract van Scenedesmus quadricauda na 24 uur inkubatie in 2 ppm 2,4-D. Het vierde van de theoretische lijst van gehydroxyleerde metaboliëten werd eveneens in deze wiersoort gedetekteerd, nl. het 5-OH-2,4-D :



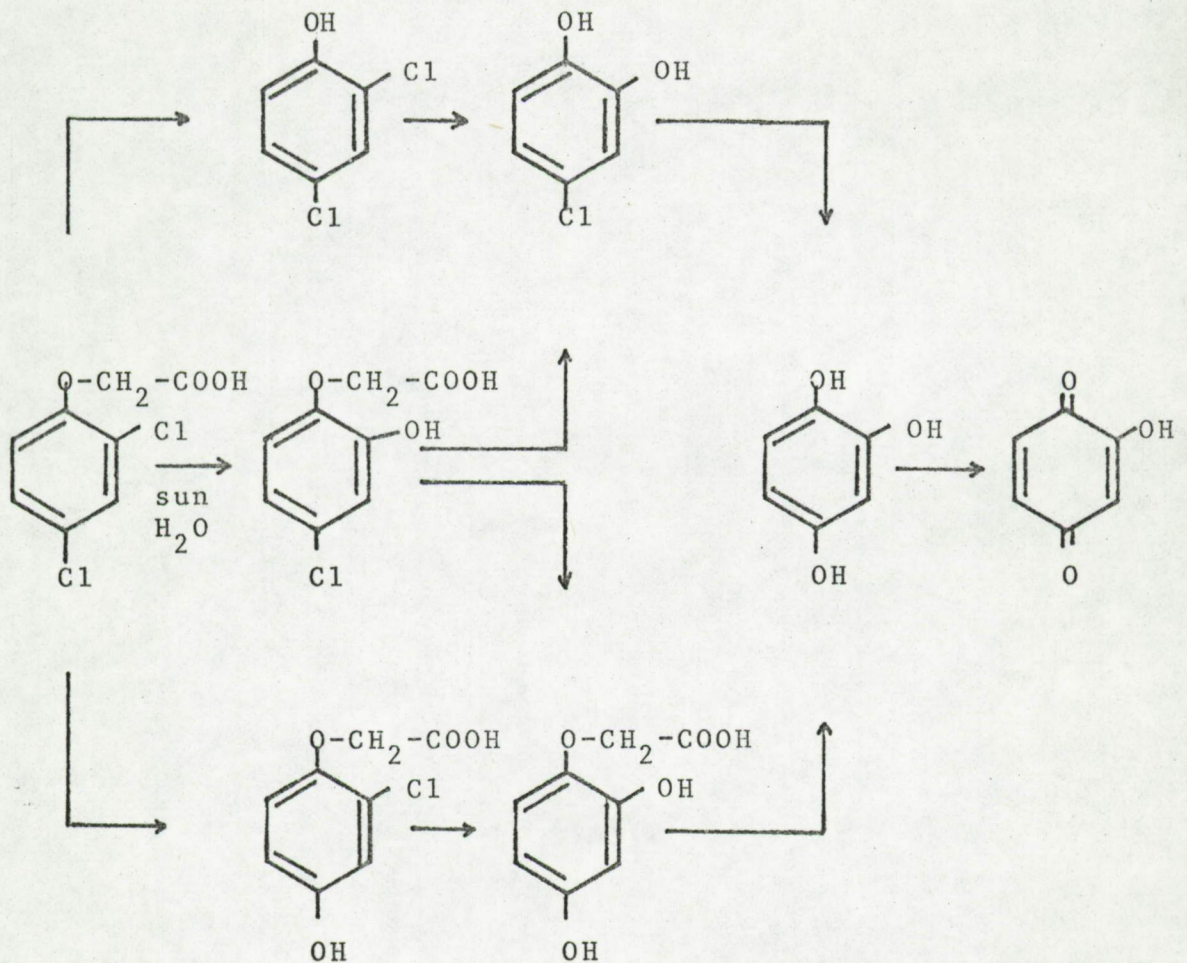
Figuur 21 : Gehydroxyleerd afbraakprodukt van 2,4-D uit het groenwier Scenedesmus quadricauda (naar VALENTINE & BINGHAM, 1974).

Het is duidelijk dat in planten zeer verschillende metaboliëten kunnen gevormd worden. Het ontstaan van de ene verbinding sluit de andere niet uit. Integendeel, sommige verbindingen zijn intermediairen van andere. Zo geven de aminozuurkonjugaten aanleiding tot de hydroxylmetaboliëten (FEUNG et al., 1974) en proteïne-komplexen kunnen een tussenstap zijn in het decarboxyleringsproces (KLEIN, 1972). Na de hydroxylering wordt de ring door een oxidatie tot een dicarbonzuur omgezet (BACH, 1961 ; KLEIN, 1972).

Terwijl de decarboxylatie een duidelijke detoxifikatie is, is dit zeker niet het geval bij de aminozuurkonjugaat-vorming. FEUNG et al. (1974) stellen zelfs de hypothese voor dat de gekonjugeerde vorm geen afbraakprodukt zou zijn, maar de fysiologisch actieve vorm van het 2,4-D.

Het 2,4-D wordt ook onder invloed van het licht afgebroken. De fotodegradatie levert meerdere fenolderivaten op afhankelijk van de pH. Onder andere wordt de fenoxagroep omgezet in het overeenkomstig fenol (BELL, 1956). Als belangrijkste ringreactie geldt de pH-afhankelijke vervanging van het chloride door een hydroxylgroep. Deze metaboliëten vormen vervolgens door condensatie gehydroxyleerde bifenylen (OMURA & MATSUMURA, 1969 ; CROSBY & WONG, 1973).

De gehele dekompositie wordt zeer goed samengevat in het schema van ROSEN (1972). (zie Figuur 22) :



Figuur 22 : Vooropgesteld fotodegradatieproces van 2,4-D in water (naar ROSEN, 1972).

Volgens FRANK (1970) is, in natuurlijke waters de hoeveelheid U.V-licht onvoldoende om het 2,4-D af te breken.

De degradatie van 2,4-D in een waterig ecosysteem gebeurt hoofdzakelijk via microbiële afbraak en is, in tegenstelling met de microbiële afbraak in terrestrische systemen, grotendeels een anaeroob proces.

ALY & FAUST (1964) stelden vast dat in een meer het 2,4-D in 20 dagen niet werd afgebroken. In het laboratorium slaagden ze er echter in een populatie mikro-organismen af te zonderen die 81 tot 85% van een 20 ppm oplossing 2,4-D kon afbreken in 24 uur.

5. HET BEPALEN VAN DE TOXICITEIT VAN CHEMIKALIËN VOOR AQUATISCHE ORGANISMEN BIJ MIDDEL VAN "BIO-ASSAYS" OF BIOTESTEN

5.1. Inleiding

In dit onderzoek verstaan wij onder "bio-assays" biologische laboratoriumexperimenten in het kader van een toxikologisch onderzoek. Bioassays leveren als dusdanig essentiële informatie over het toxisch effect van een scheikundige stof op vertegenwoordigers van het aquatisch ecosysteem.

Om een extrapolatie te kunnen maken van de resultaten van de laboratoriumproeven naar het natuurlijk milieu, moeten de omstandigheden in de experimenten zo veel mogelijk de natuurlijke omstandigheden benaderen. Daarom zullen we achtereenvolgens volgende punten behandelen :

- aard van de bioassay
- keuze van het testorganisme
- testomstandigheden
- keuze van de testkoncentraties en chemische aspecten van de bioassay
- keuze van het criterium
- verwerking van de resultaten
- interpretatie en extrapolatie.

De keuze van de methodiek die wij gebruikten is gebaseerd op "review" artikels van SPRAGUE (1969), CAIRNS (1969), LEE (1973) en STEPHAN (1975) en de voorschriften van de "Standard Methods van de American Public Health Association" (1971).

5.1.1. Aard van de bioassay

Algemeen gesproken moet er geen voorkeur gegeven worden aan een bepaald type bioassay, maar wordt voor elke situatie de keuze van het bioassay-type bepaald door de punten die werden opgesomd in het hoger vermeld lijstje. Elk van deze punten kunnen naargelang het geval een doorslaggevend karakter hebben.

Volgende alternatieve bioassay-types kunnen worden onderscheiden :

a) akute testen-chronische testen

De testduur van bioassays kan sterk verschillen, doch in elk geval moet deze duur in verhouding zijn met het ontwikkelingsstadium en de levensduur van het testorganisme. "Akute" testen, meestal akute mortaliteitstesten, bepalen de concentratie van een bepaald toxikans dat b.v. lethaal is voor een bepaalde fraktie (meestal 50%) van de testorganismen, gedurende een korte periode van hun levenscyclus. De meeste toxikanten hebben echter reeds een effect in concentraties ver beneden de lethale concentratie. Daarom werden "chronische" testen ontworpen waarbij de testorganismen gedurende hun gehele levenscyclus (voor eencellige organismen zelfs gedurende meerdere generaties) blootgesteld worden aan het uitgeteste toxikans.

b) statische testen-"continuous flow bioassays"

"Statische" bioassays worden gebruikt om de toxiciteit van een produkt te bepalen die niet door groot zuurstofverbruik wordt veroorzaakt. Er treedt dus een vergiftiging op en geen verstikking.

Indien de hoeveelheid opgeloste zuurstof tijdens de proef laag wordt en het tekort niet tijdig gecompenseerd wordt door diffusie uit de lucht, moet O_2 toegevoegd worden door doorluchting van de testoplossing tijdens de proef of door regelmatige verversing van het milieu. Beide manieren van werken werden door ons gebruikt.

Chemische produkten met een hoge COD of BOD of produkten die vluchtig of instabiel zijn en snel uit de oplossing verdwijnen (b.v. ook door opname door de testorganismen) dienen bij voorkeur onderzocht te worden in "continuous flow" bioassays ; dit zijn testen waarbij het medium voortdurend wordt verversd. Een "continuous flow" bioassay impliceert automatisch een goed geoxygeneerde testoplossing, een konstante toxikansconcentratie en een kontinu verwijderen van de metabolieten.

Een nadeel van deze soort proeven t.o.v. een statische test waar een regelmatige verversing gebeurt van het milieu in

nieuwe testrecipiënten, is het feit dat er accumulatie gevolgd door een uitloging van het toxikans kan optreden ter hoogte van de wanden van de recipiënten.

Rekening houdend met de fysische en chemische eigenschappen van de uitgeteste produkten (zie Hoofdstukken 4.1.1., 4.1.6., 4.2.1., 4.2.5.) en de duur van de proeven, werden in dit onderzoek uitsluitend statische bioassays uitgevoerd die naargelang het testorganisme, van het akute of van het chronische type waren.

5.1.2. Keuze van het testorganisme

Rekening moet gehouden worden met volgende punten, waarvan het ene een meer doorslaggevend karakter kan hebben dan het andere.

- de soort moet van lokaal belang zijn en representatief voor de groep
- de soort moet in goede konditie in het laboratorium kunnen gehouden worden
- de soort moet altijd in voldoende aantallen beschikbaar zijn, om de proeven met statistisch verantwoorde aantallen te kunnen uitvoeren. Te grote en te dure soorten zijn b.v. uitgesloten.

Om representatief te zijn voor een aquatisch ecosysteem zou ieder bioassay in feite moeten uitgevoerd worden met een waaier van organismen behorende tot de normale flora en fauna van het betrokken biotoop. Deze organismen zouden tevens representatief moeten zijn voor de verschillende trappen van de voedselketen : primaire producenten, primaire konsumenten, secundaire konsumenten en saprobionten. Bovendien moet er rekening gehouden worden met het ontwikkelingsstadium dat de organismen hebben bereikt.

In de praktijk betekent dit dat men permanent moet kunnen beschikken over een waaier van proeforganismen waarvan de biologie en de kweektechnologie zeer goed gekend zijn.

Konform met deze voorschriften selekteerden we volgende testorganismen :

(voor de krab en beide vissoorten was de mogelijkheid regelmatig te beschikken over embryonale en larvale stadia een doorslaggevend argument in de keuze).

	<u>1ste Proeforganisme</u>	<u>2de Proeforganisme</u>
<u>GROENWIJEREN</u>		
Phylum	Chlorophyta	Chlorophyta
Classis	Chlorophyceae	Chlorophyceae
Ordo	Volvocales	Chlorococcales
Subordo		Chlorococcineae
Familia	Chlamydomonaceae	Scenedesmaceae
Genus	<i>Chlamydomonas</i>	<i>Scenedesmus</i>
Species	<i>Chlamydomonas reinhardi</i> DANGEARD	<i>Scenedesmus opoliensis</i> RICHTER
<u>CILIATA</u>		
Phylum	Protozoa	
Classis	Ciliata	
Ordo	Spirotricha	
Subordo	Hypotricha	
Familia	Oxytrichidae	
Genus	<i>Oxytricha</i>	
Subgenus	<i>Stylonychia</i>	
Species	<i>Stylonychia mytilus</i> EHRENBURG	
<u>CRUSTACEA</u>		
Phylum	Arthropoda	Arthropoda
Classis	Crustacea	Crustacea
Subclassis	Branchiopoda	Branchiopoda
Ordo	Onychura	Onychura
Subordo	Cladocera	Cladocera
Familia	Daphniidae	Daphniidae
Genus	<i>Daphnia</i>	<i>Daphnia</i>
Species	<i>Daphnia magna</i> STRAUS	<i>Daphnia pulex</i> (DE GEER)

	<u>3de Proeforganisme</u>	<u>4de Proeforganisme</u>
<u>CRUSTACEA</u>		
Phylum	Arthropoda	Arthropoda
Classis	Crustacea	Crustacea
Subclassis	Branchiopoda	
Superordo	Anostraca	
Ordo		Decapoda
Subordo		Brachyura
Familia	Branchinectidae	Xanthidae
Genus	<i>Artemia</i>	<i>Rhithropanopeus</i>
Species	<i>Artemia salina</i> (L.)	<i>Rhithropanopeus harrisi</i> GOULD
	<u>1ste Proeforganisme</u>	<u>2de Proeforganisme</u>
<u>PISCES</u>		
Phylum	Pisces	Pisces
Classis	Osteichtyes	Osteichtyes
Subclassis	Actinopterygii	Actinopterygii
Ordo	Teleostei	Teleostei
Subordo	Cypriniformes	Cyprinodontiformes
Familia		Poeciliidae
Genus	<i>Brachydanio</i>	<i>Poecilia</i>
	<i>Brachydanio rerio</i> HAMILTON-BUCHANAN	<i>Poecilia reticulata</i> PETERS

5.1.3. Testomstandigheden

De te gebruiken technologische en fysico-chemische proefomstandigheden zijn funktie van zowel morfologische, ecologische, fysiologische en etologische kenmerken van de testorganismen. De proefomstandigheden moeten zodanig gekozen worden dat het gedrag van het testorganisme zoveel mogelijk het gedrag in de natuur benadert.

In een voorafgaand onderzoek werden voor elk van de gebruikte soorten de meest geschikte proefomstandigheden bepaald, wat betreft het aantal testorganismen per recipiënt, de aard en de grootte van de recipiënten, de technologie, de temperatuurs-, belichtings- en beluchtingsomstandigheden. De testorganismen werden steeds aan de testomstandigheden geaklimatiseerd gedurende een bepaalde tijd.

Artificieel zoetwater volgens CAIRNS (1969)

	gram/liter
KCl	0.02
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	0.02
NaHCO_3	0.04
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.04
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.04
CaCO_3	0.01
K_2HPO_4	0.002
Fe (ferric citrate)	0.0004

Artificieel zeewater volgens DIETRICH & KALLE (1963)

<u>Oplossing A</u>		<u>Oplossing B</u>	
NaCl	239,0 g	$\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	90,6 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	108,3 g	NaHCO_3	0,2 g
CaCl_2 anhydrisch	11,5 g	NaF	0,003 g
$\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,04 g	H_3BO_3	0,027 g
KCl	6,82 g	aqua dest.	1000 ml
KBr	0,99 g		
aqua dest.	8560 ml		

Tabel 7 : Formule van de gebruikte artificiele media.

De zeer uiteenlopende chemische samenstelling van allerhande types water kunnen de toxiciteit van de toxikanten sterk beïnvloeden (synergisme, antagonisme, precipitatie, enz...). Er moet bijgevolg zo veel mogelijk gestandaardiseerd worden hetzij door natuurlijk water te gebruiken met gekende samenstelling en geschikt voor de testorganismen, hetzij door artificieel water te bereiden.

Voor de proeven met zoetwaterorganismen gebruikten we steeds zacht water bereid volgens de formule van CAIRNS (1969) (zie Tabel 7). Voor de proeven met mariene organismen werd natuurlijk zeewater gebruikt afkomstig van een welbepaalde plaats, ofwel artificieel zeewater volgens de formule van DIETRICH & KALLE (1963) (zie Tabel 7). Het toedienen van voedingszouten (voor de groei van de wieren) en van inert voedsel (voor de invertebraten en vissen) werd eveneens gestandaardiseerd (zie 5.2.3.).

5.1.4. Keuze van de testconcentraties en chemische aspecten van de bioassay

In onze proeven werden de testconcentraties in overeenkomst met de methodiek van DOUDOROFF et al. (1951), steeds met logaritmische intervals gekozen.

Vooreerst werden "screening tests" of bruto-testen uitgevoerd om het tolerantiegebied grofweg te bepalen ; vervolgens werd deze "critical range" nauwkeuriger onderzocht aan de hand van verfijnde testen. Onder "critical range" verstaan we het gebied tussen de hoogste concentratie waarbij het gekozen criterium niet wordt waargenomen en de laagste concentratie waarbij het effect maximaal is.

De fysicochemische omstandigheden en de toxikansconcentratie in de verschillende verdunningen werden in de mate van het mogelijke regelmatig bepaald. Indien de bekomen waarden meer dan 10% afweken van de omstandigheden bij de start van de proef, werden de resultaten van de proef niet in aanmerking genomen, en werd de proef herbegonnen.

5.1.5. Kriterium

De keuze van een kriterium is vrijwel onbeperkt. Het belangrijkste en meest gebruikte kriterium is de mortaliteit. De reden hiervoor is dat het kan gebruikt worden voor bijna alle organismen en alle toxikanten. De subletale criteria zijn gevoeliger en veel specifiekere. De subletale criteria die wij gebruikten zijn kenmerkend voor de testorganismen en houden alle verband met de reproductie of ruimer gezien met de populatiegroei.

5.1.6. Verwerking van de resultaten

Uit de resultaten van een toxiciteitstest leidt men de concentratie van een bepaald toxikans af waarbij het gekozen kriterium wordt waargenomen bij een bepaalde fraktie (meestal 50%) van de testorganismen tijdens een welbepaalde testduur.

De effecten, waargenomen bij elk van de uitgeteste dosissen (gekozen in logaritmen), zijn verdeeld volgens een normaal-distributie. Omgerekend in logaritmen of uitgezet op logaritmisch papier ziet de dosis-effekt-kurve er uit als een sigmoïde gelijk aan de kumulatieve normaalkurve (BLISS, 1937).

Indien het percent effect omgerekend wordt in functie van 0.05 probabiliteit, wordt de sigmoïde kurve omgevormd in een rechte. Deze omrekening in "probits" volgens de methode van BLISS (1937), kan vermeden worden door het procentuele effect uit te zetten op probabiliteitspapier (LITCHFIELD, 1949).

Uit deze grafiek kan vervolgens de ED_{50} of "median effective dose" berekend worden, een begrip dat in de farmacologie gebruikt wordt zowel voor letale als subletale effecten.

Indien echter een letaal effect werd beschouwd gebruikten we liever de term TL_{50} of "median tolerance limit", algemeen toegepast in de literatuur over visbioassays.

Een eerste methode voor het bepalen van de ED_{50} aan de hand van een grafiek op log-probit-papier is de visuele

lineaire interpolatie volgens LITCHFIELD (1949). Uit het snijpunt van deze rechte met de 50% effekt-lijn kan de ED_{50} -waarde worden afgelezen. Om de vertrouwensgrenzen van deze waarde te bepalen gebruikt men de methode van LITCHFIELD & WILCOXON (1948).

Beide methoden werden door ons aangewend naargelang het aantal intermediaire waarnemingen tussen 0 en 100% effekt.

5.1.7. Interpretatie en extrapolatie

Voor een verantwoorde interpretatie van een bioassay is het noodzakelijk te beschikken over :

- voldoende biologische kennis aangaande het proefobject en zijn reaktie op de uitgeteste stof
- voldoende chemische en fysische informatie over de teststof en haar gedrag tijdens de proefomstandigheden.

Synergismen, antagonismen of andere interacties van chemische componenten kunnen immers niet altijd achterhaald worden, maar zijn automatisch in de resultaten omvat. Bij het ontwerpen van een proef is de kennis over het chemisch gedrag van het toxikans niet strikt noodzakelijk ; deze is daarentegen essentieel voor de interpretatie en de toepassing van de resultaten.

Aan de hand van de TL_{50} -waarden kon een "safe concentration" worden berekend. Meerdere formules werden hier voor voorgesteld, waarvan de meest eenvoudige erin bestaat de TL_{50} -waarde te vermenigvuldigen met een faktor 1/10 of 1/100 (1).

Een goed betrouwbare "veilige toepassingskoncentratie" voor een bepaald organisme kan echter slechts worden afgeleid uit meerdere proeven met verschillende criteria die de gehele levenscyclus van de soort beslaan (proeven op lange termijn = "long-term-bioassays"). Doch de grote verschillen tussen de resultaten met verschillende soorten organismen be-

(1) U.S. Department of the Interior. Federal Water Pollution Control Administration. Training Program, December 1969.

wijzen hoe relatief een veilige toepassingsnorm is. Bovendien zijn de gebruikte criteria voor het bepalen van het toxisch effect van een produkt, niet bruikbaar voor het opstellen van een veilige toepassingsnorm van een stof, die door de testorganismen wordt gekoncentreerd en door de voedselketen wordt vermeerderd. Een organisme kan immers blijven leven in bepaalde concentraties aan toxikans, maar terzelfdertijd dit produkt in zijn lichaam concentreren tot gehalten die schadelijk kunnen zijn voor de organismen die zich met de eerstvernoemde organismen voeden.

Daarom hebben we op het einde van dit hoofdstuk over toxiciteit van paraquat, diquat, 2,4-D, lissapol NX en ethomeen S25 nog geen besluiten getrokken in verband met de gebruiksvoorschriften voor de herbiciden, maar behandelden wij eerst een hoofdstuk over de invloed van additieven op de toxiciteit van paraquat en een hoofdstuk over de partitionering van deze produkten tussen de vloeibare en de vaste fraktie van een systeem.

5.2. Toxiciteitsonderzoek op wieren

5.2.1. Gegevens over de gebruikte soorten en de technieken voor het onderhouden van de stocks

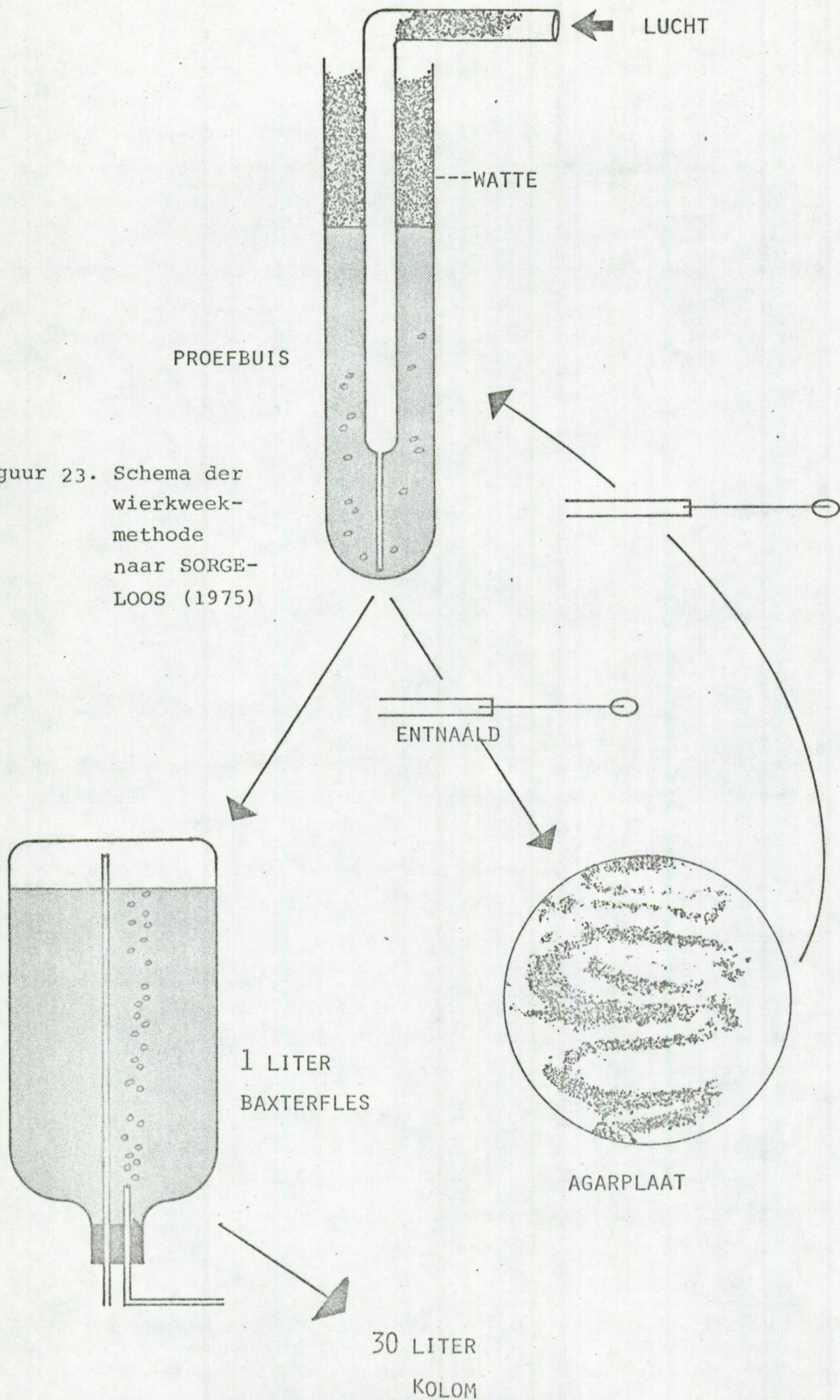
Als vertegenwoordigers van het eerste trofisch niveau werden twee Chlorophyceae als testorganismen voor onze toxiciteitsproeven gebruikt.

De gebruikte wiersoorten zijn Scenedesmus opoliensis RICHTER, een coenobiaal groenwier van de groep der Chlorococcales en Chlamydomonas reinhardi DANGEARD, een eencellige vertegenwoordiger van de groep van de Volvocales.

S. opoliensis werd geïsoleerd door Dr. P. SORGELOOS¹ en G. UYTTERSROT¹ en gedetermineerd door D. SOMERS². De C. reinhardi-stam werd geïsoleerd en gedetermineerd door Dr. MEYER³. Deze determinatie werd, nadat de ent in het laboratorium in kultuur was gebracht, bevestigd door Dr. N. DE PAUW¹.

1. Laboratorium voor Biologisch Onderzoek van Milieuverontreiniging R.U.G.
 2. Laboratorium voor Morfologie en Systematiek der Planten - R.U.G.
 3. TNO, Centraal Laboratorium, Delft, Nederland.

Figuur 23. Schema der
wierkweek-
methode
naar SORGE-
LOOS (1975)



Beide wiersoorten werden gekweekt volgens de gestandardiseerde techniek van PERSOONE & SORGeloos (1975) : de wierstocks worden onderhouden in een traag vermenigvuldigingsritme op een compleet medium in steriel bereide agarplaten bij ca 21°C en zwakke belichting. Vervolgens wordt een kolonie wiercellen van de agar overgeënt in een proefbuis met 10 ml artificieel zoetwater (formule van CAIRNS (1969) voor zacht water)(zie Tabel 7) aangerijkt met een voedingsmedium (zie 5.2.3.). Deze stockkulturen worden kontinu belicht met 2 TL-lampen van 65 Watt (+ 2000 lux) en doorborreld met perslucht via een kapillair op de bodem van de buis. De inkubatietemperatuur bedraagt 21°C. Van zodra deze (niet axenische) monokultuur in de exponentiële groeifase (zie volgende paragraaf) is gekomen, wordt de suspensie overgebracht in een cylindronische buis met nuttige inhoud van 100 ml met hetzelfde medium en verder gekweekt in dezelfde omstandigheden. Van hieruit wordt één liter kultuur aangelegd in omgekeerd opgehangen baxterflessen. En schema van de gebruikte techniek, naar SORGeloos (1975) is in Figuur 23 weergegeven.

5.2.2. Bepaling van de groei van wierkulturen

Het toxikologisch onderzoek en ook het voorafgaand onderzoek voor het bepalen van een geschikt kweekmedium werden uitgevoerd met kulturen van wiercellen in tamelijke hoge densiteiten.

Om de invloed van een of ander medium of van een of ander toxikans op de groei van deze wierkulturen na te gaan, dient een maatstaf voor de wiergroei gekozen te worden. Het meest gebruikte criterium hiervoor is het aantal wiercellen/ml in functie van de tijd.

De resultaten worden grafisch weergegeven door groeikurven. Zoals bij de groei van bacteriën kan men in groeikurven van planktonische mikroskopische wieren vier fasen onderscheiden (FOGG, 1966) :

1. de aanloopfase of lag-faze
2. de exponentiële faze of log-faze
3. de stationaire faze of plateaufaze
4. de afstervingsfaze.

In de exponentiële fase groeit de wierkultuur evenredig met het aantal aanwezige cellen. Vandaar dat het aantal nieuwe cellen per tijdseenheid (of de groeisnelheid van de populatie) kan uitgedrukt worden door een MONOD (1949)-vergelijking (GUILLARD, 1973) :

$$\frac{dN}{dt} = K_e N \quad (1)$$

waaruit N : aantal cellen in de kultuur

t : tijd

K_e : groeikonstante tijdens de exponentiële fase

na integratie wordt deze vergelijking

$$\ln N = K_e t + \text{cte} \quad (2)$$

Op het tijdstip $t = 0$ is $N = N_0$ en bijgevolg

$$\ln N_0 = \text{cte} \quad (3)$$

(3) gesubstitueerd in (2) geeft

$$\ln N = K_e t + \ln N_0$$

$$\text{of } K_e = \ln \frac{N}{N_0} \cdot \frac{1}{t} \quad (4)$$

vgl. (4) kan evengoed opgesteld worden voor het tiendelig en het tweedelig logaritmisch stelsel en wordt dan :

$$K_{10} = \log_{10} \frac{N}{N_0} \cdot \frac{1}{t} \quad (5)$$

$$k = \log_2 \frac{N}{N_0} \cdot \frac{1}{t} \quad (6)$$

Aan de hand van vgl. (4), (5) en (6) kan men de groeikonstante in de exponentiële groeifase berekenen van een populatie van organismen met een binaire deling, t.t.z. waarbij elke cel slechts aanleiding geeft aan twee dochtercellen. Deze vergelijkingen drukken de groeikonstante uit, respectievelijk in het neperiaans, het tiendelig en het tweedelig logaritmen stelsel. Indien t uitgedrukt is in dagen geeft k het aantal delingen per dag weer.

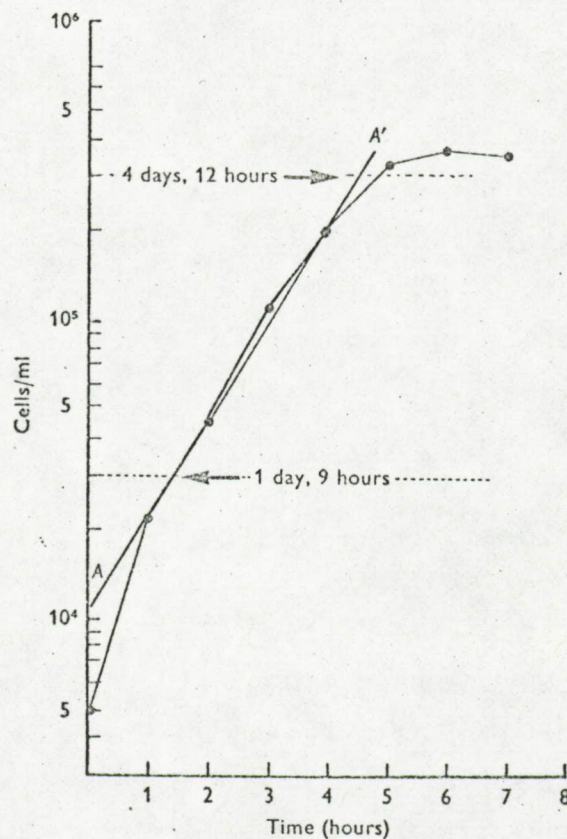
Tussen K_e en K_{10} en k bestaat volgend verband :

$$k = \frac{k_e}{0.6931} = 3.322 K_{10} \quad (7)$$

De generatietijd T , of de tijd die een wierpopulatie nodig heeft om in aantal individuen te verdubbelen kan gemakkelijk berekend worden aan de hand van vgl. (6) waarbij $N = 2.N_0$. Opgelost wordt dit :

$$T = \frac{1}{k} \quad (8)$$

Naar analogie met de logaritmische transformatie in deze berekening, kan men de resultaten grafisch voorstellen in "Semi-log"-papier. Het rechtlijnig stuk van de kurve geeft dan de exponentiële groei van de populatie weer en de richtingscoëfficiënt van deze rechte is een maat voor K_{10} (Fig. 24).



Figuur 24 : Experimentele groeikurve van Cyclotella cryptica, uitgezet op semilogaritmisch papier. AA' = exponentiële groei van de wierpopulatie. (naar GUILLARD, 1973).

Tabel 8 . Media voor wierkweek .

Medium van VLASBLOM (1963) (= modifikatie van het medium van WALNE, 1956)

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,278g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 3g
NaNO_3	: 30g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 0,47g
glycine	: 50g
aq.dest. tot 1 liter	

Medium ES van PROVASOLI, McLAUGHLIN & DROOP (1957)

NaNO_3	: 350mg
Na_2HPO_4	: 50mg
Vit. B ₁₂	: 10 µg
Thiamine	: 0,5mg
Biotine	: 5µg
Fe (1)	: 25ml
PII metaal mengsel (2)	: 25ml
aq.dest.	: 100ml
pH stellen op 7,8 met HCl	

(1) $\text{Fe} (\text{NH}_4)_2 (\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 351mg
$\text{Na}_2 \text{EDTA}$: 350mg
aq.dest.	: 500ml

(2) H_3BO_3	: 114mg
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 4,9mg
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 16,4mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 2,2mg
$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,48mg
$\text{Na}_2 \text{EDTA}$: 100mg
aq.dest.	: 100ml

5.2.3. Uittesten van geschikte voedingsmedia voor Chlamydomonas reinhardi en Scenedesmus opoliensis

De criteria voor de populatiegroei van een wierkultuur, zoals beschreven in voorgaande paragraaf zijn alleen toepasselijk voor organismen met een binaire, m.a.w. een asexuele voortplanting.

Bij het genus Scenedesmus is enkel een asexuele voortplantingswijze bekend. Chlamydomonas daarentegen kent naast een vegetatieve tevens een sexuele voortplanting. Deze wordt als volgt door DANGEARD (1933) beschreven :

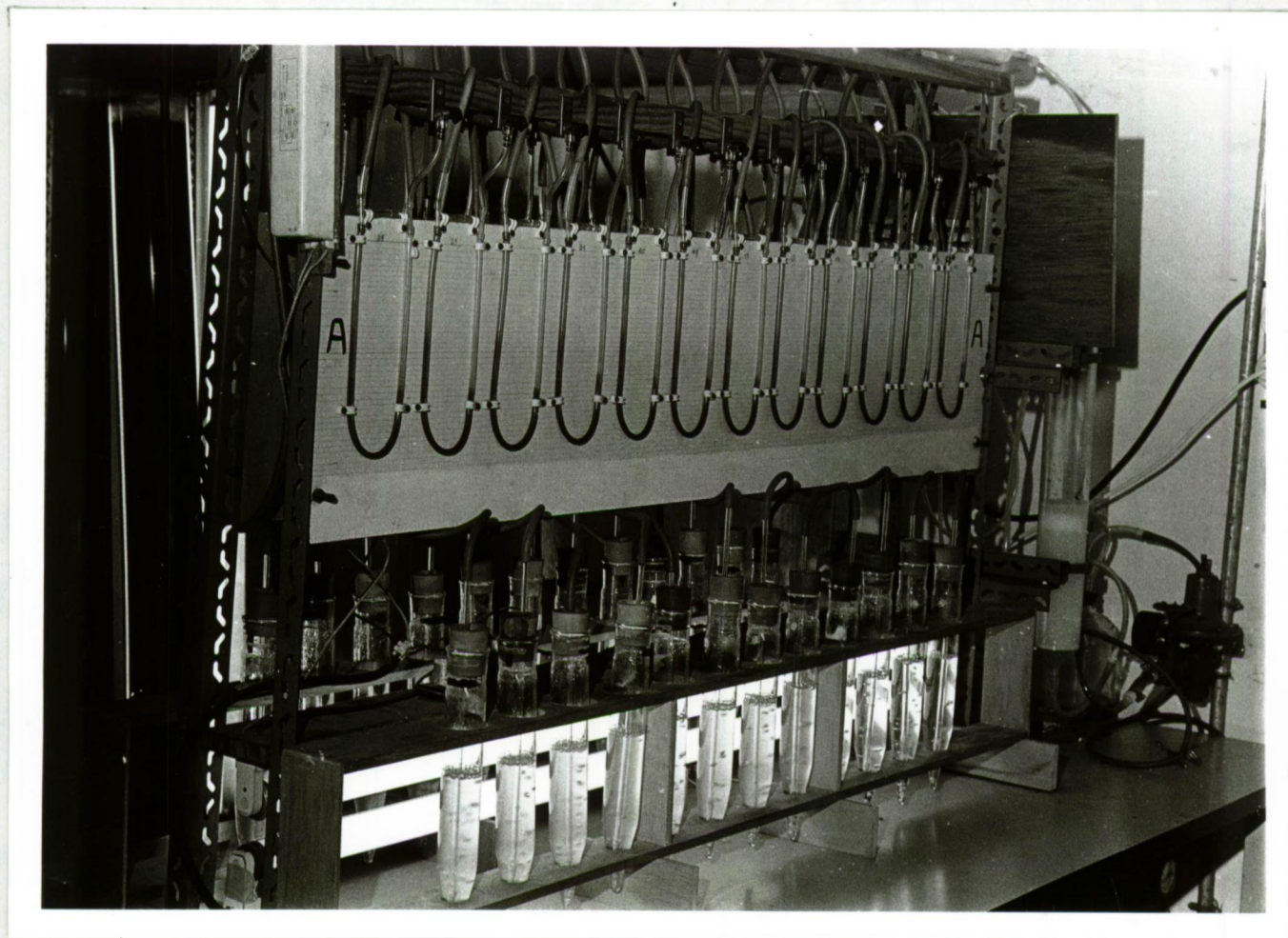
Bij de sexuele voortplanting gedraagt C. reinhardi zich als een heterothallisch isogamisch wier ; de reproductie wordt achtereenvolgens gekenmerkt door "cluster"-vorming, paring tussen de mannelijke en vrouwelijke gameten, fusie en vorming van een zygote, die via een reductiedeling aanleiding geeft aan haploïde sporen van waaruit de nieuwe gametofyten ontstaan.

Al deze verschillende celvormen bemoeilijken uiteraard een adekwate telling.

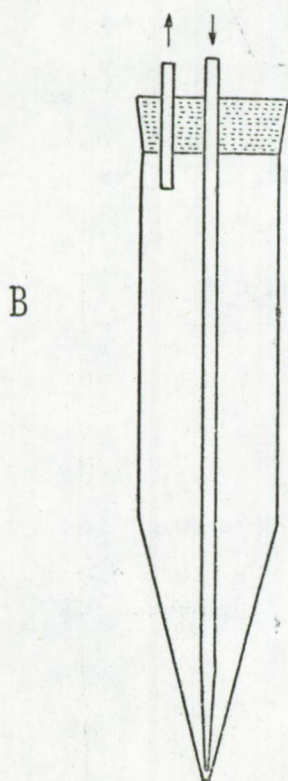
Wanneer gameten van de twee geslachten in dezelfde kultuur voorkomen, duurt het gehele proces tot de zygote-vorming slechts 30 minuten. De eerste stap is de "cluster"-vorming of aggregatie van gameten. Hierbij zijn de zeer actieve flagellen naar het centrum gericht. Deze celgroepen vallen uiteen in "vis-a-vis"-zwemmende paren gameten van tegengesteld geslacht. De paring gebeurt eerst alleen ter hoogte van de flagellen maar evolueert verder zodanig dat een fusie mogelijk wordt en een zygote kan gevormd worden (SAGER & GRANICK, 1954).

Geschikt voedingsmedium voor Chlamydomonas reinhardi :

In een vergelijkende studie van de sexuele voortplanting bij 4 Chlamydomonas-soorten, o.a. C. reinhardi, bewijzen SAGER & GRANICK (1954) en TRAINOR (1959) dat deze voortplantingswijze van C. reinhardi gecontroleerd wordt zowel door het stikstof-gehalte van het voedingsmilieu als door de duur en de intensiteit van de belichting. Het N-gehalte blijkt nochtans de sleutelfactor te zijn.



A



B

Figuur 25 A:Opstelling voor bioassays met mikroalgen (naar PERSOONE & UYTTERSROT, 1972)

B:Detail van een kweekbuis (naar PERSOONE & SORGELOOS, 1975).

Op basis van deze kennis hebben wij getracht een geschikte samenstelling van het voedingsmilieu te vinden waarbij wordt verhinderd dat C. reinhardi overgaat tot een geslachtelijke voortplanting, met de voor de tellingen problematische vorming van "clusters", paren en zygoten.

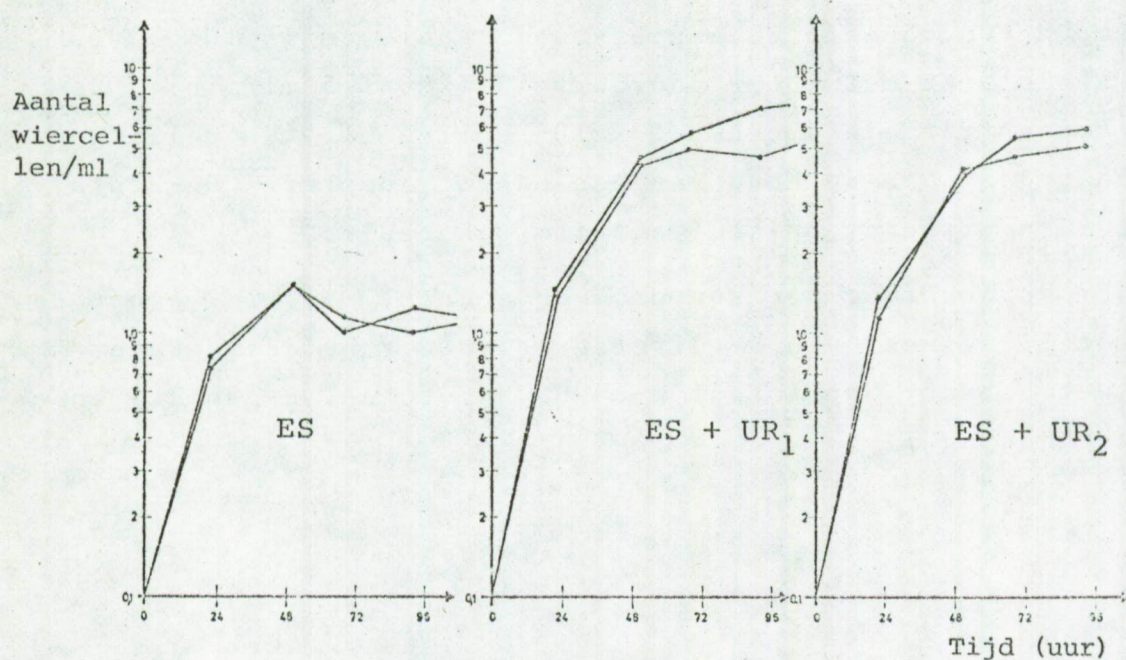
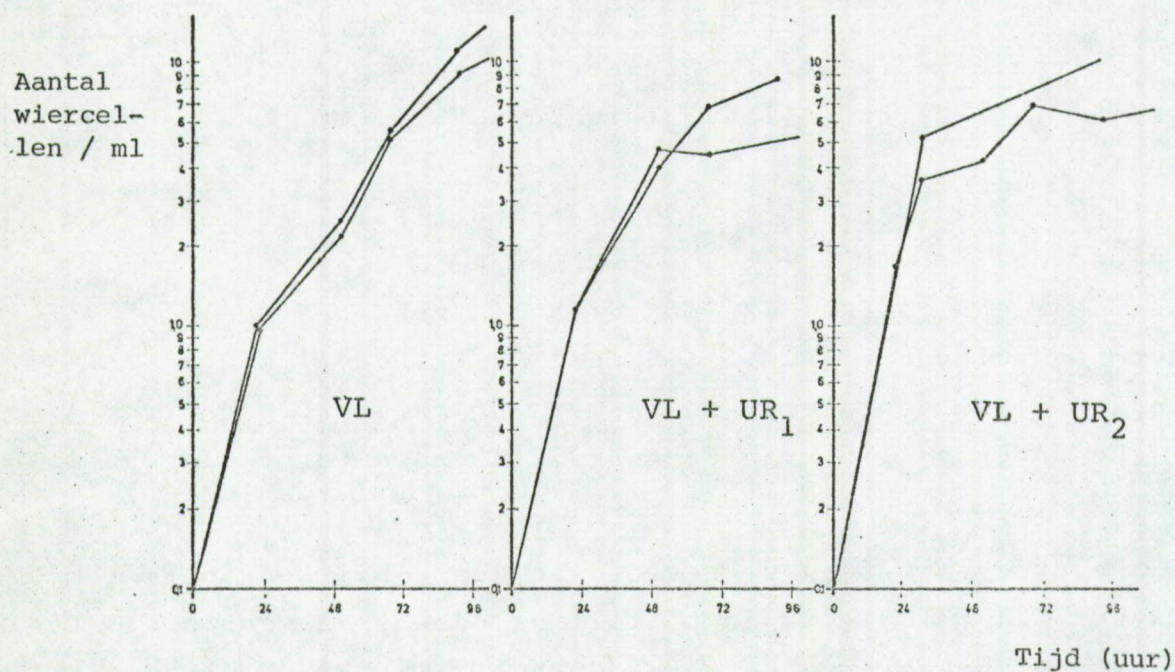
Volgende media werden uitgetest :

- medium van VLASBLOM (1963) (afgekort VL) : 10 cc stockoplossing/l
- milieu ES van PROVASOLI (1957)(afgekort ES) : 20 cc stockoplossing/l
- medium I van SAGER & GRANICK (1954)(afgekort S & G)
- een mengsel van ES en VL : 5 cc/l VL + 10 cc/l ES
- mengsels van voornoemde media met 100 en/of 200 mg ureum/l.

De samenstelling van de gebruikte media wordt gegeven in Tabel 8.

De proeven werden uitgevoerd in duplo bij konstante temperatuur ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), in de opstelling ontworpen voor bioassays met wieren, beschreven door PERSOONE & UYTTERSROT (1972) (Figuur 25A en B). De buizen werden kontinu belicht met 2 TL-lampen van 65 Watt op een afstand van 10 cm (= 1000-2000 lux) en kontinu met lucht doorborreld (200 ± 5 ml/min). De startconcentratie bedroeg 0.1×10^6 cellen/ml. De tellingen werden gedaan aan de hand van een haemocytometer. De aantallen werden uitgezet op semilogaritmisch papier.

Er werden twee reeksen proeven gedaan. Tabel 9 geeft de samenstelling weer van de diverse media uit beide reeksen voor wat betreft het totaal N-, NO_3^- .N-, totaal P-gehalte en N/P-verhouding :



Figuur 26 : Experimentele groeikurven van Chlamydomonas reinhardtii in verschillende voedingsmedia.
Eerste reeks proeven.

Tabel 9 : Samenstelling van de media in de 1ste en 2de reeks proeven met Chlamydomonas reinhardi.

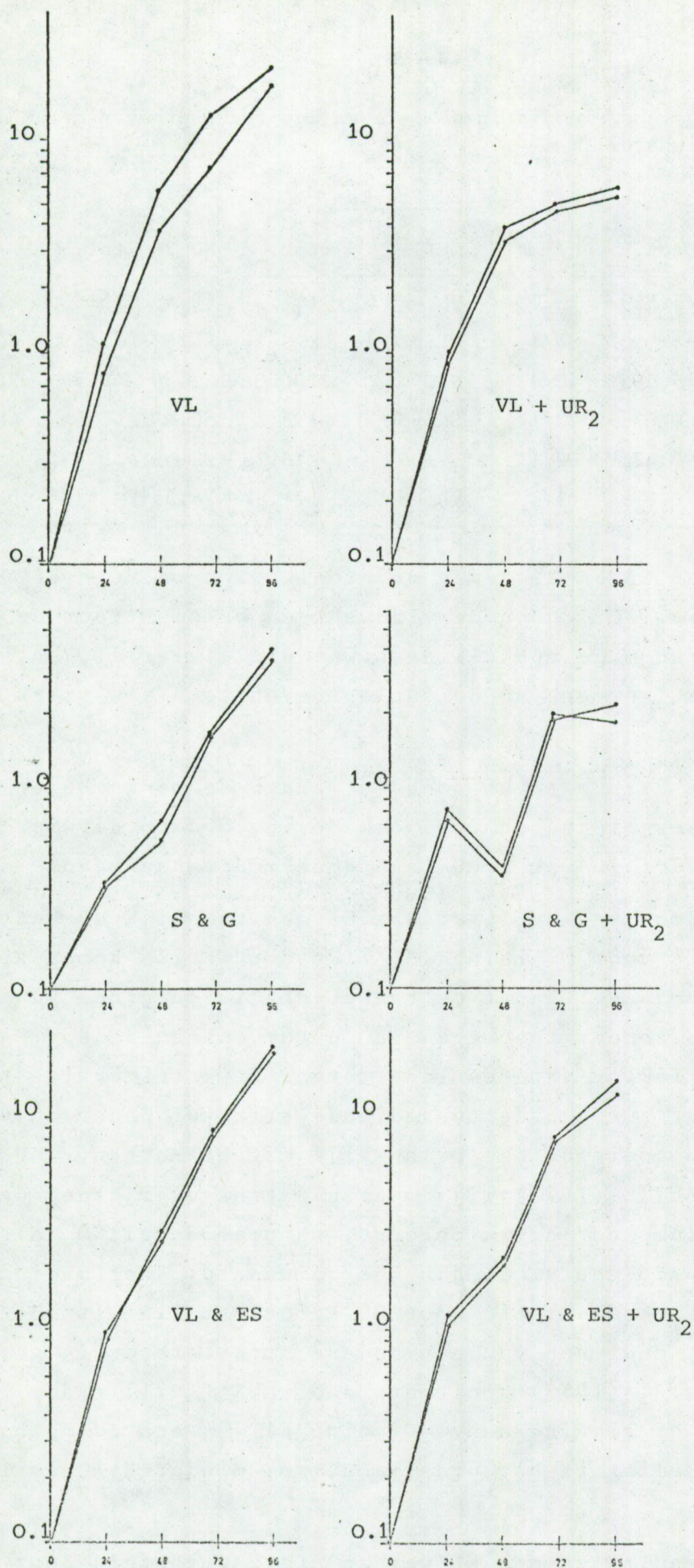
<u>1ste reeks</u>					<u>2de reeks</u>				
mg/l	tot. N	$\text{NO}_3^- \cdot \text{N}$	tot.P	N/P	mg/l	tot. N	$\text{NO}_3^- \cdot \text{N}$	tot. P	N/P
VL	141.9	49.4	5.595	25/1	VL	141.9	49.4	5.595	25/1
VL+UR ₁	188.5	49.4	5.595	34/1	VL+UR ₂	235.1	49.4	5.595	42/1
VL+UR ₂	235.1	49.4	5.595	42/1	S&G	100.0	52.49	40.54	26/1
ES	15.53	7.69	0.675	23/1	S&G+UR ₂	193.2	52.49	40.54	48/1
ES+UR ₁	62.13	7.69	0.675	92/1	VL+ES	78.72	28.55	3.135	25/1
ES+UR ₂	108.73	7.69	0.675	161/1	VL+ES+UR ₂	171.92	28.55	3.135	55/1

Figuur 26 en 27 geven de groeikurven weer in de verschillende media. Ofschoon de eindwaarden bekomen voor de 2 parallellen, in sommige opstellingen wat uit elkaar liggen, vertonen de groeikurven van de duploproeven toch een sterk gelijklopend verloop.

In de eerste reeks proeven werden de media ES en VL met elkaar vergeleken en werd ook de invloed op de wiergroei van een additie van ureum aan deze media nagegaan.

Uit deze reeks blijkt dat ES een tamelijk ongunstige voedingsbodem is voor C. reinhardi : de populaties komen zeer vlug in plateau-faze. Vanaf de tweede dag is de groei van de populatie in ES zonder toevoegen van ureum onbeduidend. Naast de limiterende faktor van een laag totaal stikstofgehalte kan ook het feit dat 50% van de toegediende stikstof onder de vorm van $\text{NO}_3^- \cdot \text{N}$ is toegediend, een belangrijk effect hebben. MUR (1971) en WESSELIUS (1973) wijzen erop dat na vijf dagen de pH van het medium zeer sterk oploopt, wanneer enkel NO_3^- als stikstofbron wordt gebruikt, daar de anionen uit het medium verdwijnen. Een compensatie door CO_2 -doorborreling is mogelijk, maar het toedienen van een andere stikstofbron is gewenst. DAVIS e.a. (1953) geciteerd door MUR (1971) raden hiervoor ureum of glycine aan. Glycine blijkt echter de bacteriële ontwikkeling te bevoordelen, wat minder het geval is met ureum.

De resultaten met ES werden sterk verbeterd door toevoeging van ureum aan het medium. Ook in de mengsels van



Figuur 27 : Experimentele groeikurven van Chlamydomonas reinhardtii in verschillende voedingsmedia
Tweede reeks proeven

VL met ureum hebben de wierkulturen een snellere groei vanaf de start, maar de populatie bereikt tevens vlugger de plateau-faze.

Zowel met ES als VL als medium schijnt de hoeveelheid toegevoegde ureum niet bepalend te zijn voor de populatiegroei.

In de tweede reeks proeven werden de media VL, S & G en VL+ES met elkaar vergeleken. VL en VL+ES gaven zeer goede resultaten. S & G bleek minder geschikt te zijn.

Zoals beschreven hierboven is de richtingscoëfficiënt van de logaritmisch getransformeerde groeikurven, een maat voor de groeikonstante van de wierpopulatie. Bij de start en het einde van de proef is deze richtingscoëfficiënt van de groeikurve groter voor VL+ES dan voor VL alleen. Dit betekent dat in het medium VL+ES de populatiegroei een ietwat vluggere start heeft en na 5 dagen nog geen afremming vertoont, in tegenstelling met de resultaten in VL.

Wanneer echter ook de konditie waarin de wieren zich bevonden in de besluitvorming wordt betrokken, blijkt dat VL+ES toch minder geschikt is omdat er in dit medium een belangrijke zygotevorming optrad.

In het medium S & G trad een schimmelinfektie op die door het toevoegen van ureum nog werd gestimuleerd met volledige vernietiging van de cultuur als gevolg.

Indien ureum werd toegevoegd aan de media VL en VL+ES kende de populatie opnieuw een vluggere start maar bereikte ook vlugger de plateaufaze. In het medium VL+ES+UR₂ trad er hoofdzakelijk een sexuele voortplanting op. Er bestaat dus een zekere kontroverse met de konklusies van SAGER & GRANICK (op.cit.) : "Gametes can be dedifferentiated to the vegetative state by any nitrogen compound which the cells can use for growth".

Volgens deze auteurs kan zowel nitraat-stikstof als ammonium-stikstof deze inversie teweeg brengen. Uit onze proeven blijkt dat ureum-stikstof dit blijkbaar niet kan.

Onafgezien van het reproductiemechanisme groeit C. reinhardi wel op een medium met ureum als enige stikstofbron

(SAGER & GRANICK, 1953) maar niet op een medium met nitraat als enige stikstofbron (LEWIN, 1962).

Het "trigger"-mechanisme voor de geslachtelijke voortplanting van C. reinhardi is dus niet zo eenvoudig als wordt gesteld door SAGER & GRANICK (1954). Een associatie tussen het assimilatievermogen van bepaalde stikstofbronnen door dit wier, en dit "trigger"-mechanisme is eveneens moeilijk te maken.

- Uit deze proeven onthouden we voornamelijk dat :
- van de 3 uitgeteste kweekmedia is VL het meest geschikte voor C. reinhardi ; S & G en ES zijn minder geschikt.
 - nog betere resultaten werden bekomen met het 1:1 mengsel ES+VL, doch de sexuele voortplanting van de wiercellen werd in dit medium niet geremd. Mengsels met andere verhoudingen kunnen in die optiek verder worden uitgetest.
 - indien ureum aan de media wordt toegevoegd wordt het hele groeiproses van de wierpopulatie versneld, maar wordt tevens de plateaufase vroeger bereikt.

Geschikt voedingsmedium voor Scenedesmus opoliensis :

Onderzoekingen naar de ideale samenstelling van een artificieel medium voor het kweken van Scenedesmus acutus var. alternans Hortobagyi werden in ons laboratorium uitgevoerd door WINDELS (1975) en DE HAEMERS (1975). De beste groeiresultaten werden bekomen met een 1/1 mengsel van de media ES en VL.

In onze stockkulturen van 1 liter werden zowel Chlamydomonas reinhardi als Scenedesmus opoliensis gekweekt op het 1:1 mengsel van ES en VL met 78.72 mg N/l en 3.135 mg P/l. In de bioassay-proeven daarentegen die van relatief korte duur (5 dagen) waren, werd het medium van VLASBLOM (op.cit.) gebruikt met 141.9 mg N/l en 5.595 mg P/l.

5.2.4. Bioassay-techniek

De bioassays met mikroalgen werden uitgevoerd in dezelfde proefopstelling en proefomstandigheden als deze be-

schreven bij de proeven voor het bepalen van een geschikt medium (zie 5.2.3.). Als voedingsmilieu werd 100 ml medium volgens VLASBLOM (1963) gebruikt.

Vermits de kulturen niet axenisch zijn, werd bij de start een tamelijk gekoncentreerde ent genomen om een te vlotte ontwikkeling van de bacteriën ten nadele van de wieren te verhinderen : 0.1×10^6 cellen/ml voor Chlamydomonas reinhardi en 0.5×10^6 cellen/ml voor Scenedesmus opoliensis.

Bij een startconcentratie van 0.1×10^6 cellen/ml zal de Chlamydomonas reinhardi-kultuur in de gegeven omstandigheden onmiddellijk in de exponentiële groeifase treden. Het verschil in startconcentratie voor beide wiersoorten houdt verband met het feit dat Scenedesmus opoliensis een soort is waarvan de cellen in gunstige omstandigheden in een 4-cellig coenobium gegroepeerd zijn. In de meeste bioassays wordt het percentage 4-cellige vormen sterk verminderd en komen in hoofdzaak 1-cellige vormen voor. Het aantal cellen wordt daarom steeds uitgedrukt in cel-eenheden onafhankelijk van het feit of het 1-cellige of 4-cellige vormen betreft. Indien alle cellen onder de vorm van een coenobium aanwezig zijn, is er een startconcentratie van 0.5×10^6 cellen/ml ekwivalent aan 0.125×10^6 coenobia/ml. Overigens verwijzen we naar de analoge proeven van PERSOONE, DE PAUW & CATTOIR (1975) met Scenedesmus acutus, waaruit blijkt dat een startconcentratie van 0.5×10^6 cellen/ml (op dezelfde manier uitgedrukt) te verkiezen is boven een startconcentratie van 0.1×10^6 cellen/ml.

Alle testen werden in 3 of 4 parallellen uitgevoerd en duurden 5 dagen. Dagelijks werd de wiercelconcentratie bepaald met behulp van een haemocytometer of met behulp van automatische partikeltellers : TOA Microcell Counter voor Chlamydomonas reinhardi en de Coulter Counter model ZB voor Scenedesmus opoliensis.

Het is duidelijk dat bij het evalueren van het effect van een toxikans op de groei van een wierpopulatie behalve de exponentiële groeifase (uitgedrukt door de groeikonstante) ook de aanloophase en de plateaufase hun belang hebben. Een produkt kan bijvoorbeeld vanaf de start van de proef de

wiergroei stimuleren en een snelle exponentiële groei induceren, maar daarnaast ook de stationaire groeifaze bespoedigen. In een ander geval kan de wierpopulatie een lange aanloopfaze kennen maar nadien een overweldigende exponentiële groei. Voor beide gevallen geeft de exponentiële groeikonstante de werkelijke groei slecht weer.

Daarom werden twee andere parameters in beschouwing genomen : enerzijds de celkoncentratie bij het einde van de proef en anderzijds de integraal van de groeikurve berekend met 6 punten aan de hand van de formule van BODE (volgens PERSOONE & UYTTERSROT 1972). Deze waarden werden dan uitgedrukt als procent t.o.v. de blanco-opstelling zonder toxikans.

Voor de wiskundige verwerking van de resultaten (grafieken en integralen) werd van de parallelle opstellingen steeds slechts deze in beschouwing genomen die op het einde van het experiment de beste resultaten (hoogste wierkoncentratie) vertoonde en als dusdanig de best mogelijke groei suggereerde in de gegeven omstandigheden (PERSOONE & UYTTERSROT, op.cit.).

Proeven waarbij de eindresultaten van de 3 parallelen meer dan 25% van elkaar afweken werden niet in beschouwing genomen.

De testkoncentraties van de toxikanten werden met logaritmische intervals gekozen. De toxiciteitstesten gebeurden in twee fazen, t.t.z. een bruto-proef gevolgd door een verfijnde proef (DOUDOROFF et al., 1951). In de brutoproeven waren de extremen van de reeks onderzochte concentraties steeds 0.1 tot 1000 ppm. In het tolerantiegebied werden verfijnde proeven uitgevoerd waarbij er tevens minimum drie intermediaire concentraties tussen twee opeenvolgende concentraties van de brutoproeven werden uitgetest. Deze intermediaire concentraties werden eveneens met logaritmische intervals gekozen.

De ED_{50} -waarde werd bepaald aan de hand van de eindkoncentratie-waarden en integraalwaarden uitgedrukt als procent t.o.v. de blanco-waarde. De bepaling gebeurde grafisch op log-probabiliteitspapier met de "standard graphical interpolation method" van LITCHFIELD (1949).

5.2.5. Resultaten van de "Algal assays" met paraquat, diquat, 2,4-D en de twee uitvloeiers van paraquat

Figuren 28 tot 31 geven de groeikurven weer voor de proeven met 2,4-D, diquat, PMU (paraquat met uitvloeiers), PZU (paraquat zonder uitvloeiers), lissapol NX en ethomeen S25.

In Tabel 10 worden de ED_{50} -waarden weergegeven berekend aan de hand van de integraal van de groeikurven en aan de hand van de eindconcentratie van de wiersuspensies.

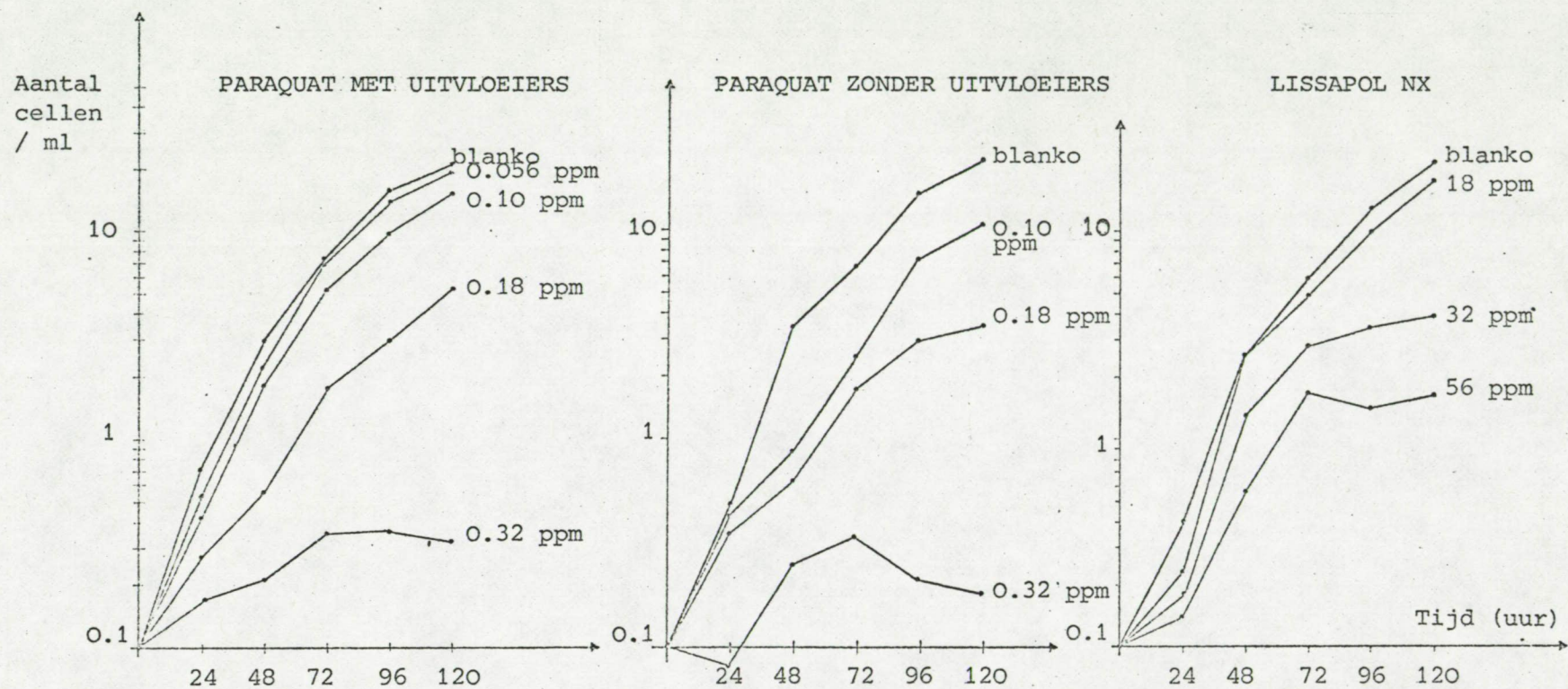
ED_{50} (ppm)	PMU	PZU	lissapol NX	ethomeen S25	diquat	2,4-D
<u>Chlamydomonas reinhardi</u> :						
Integraal	0.14	0.10	30.3	1.1	0.12	305
Eindconcentratie	0.13	0.09	22.3	1.0	0.11	412
<u>Scenedesmus opoliensis</u> :						
Integraal	0.40	0.33	37.5	1.33	0.52	800
Eindconcentratie	0.37	0.27	35.5	1.53	0.52	715

Tabel 10 : ED_{50} -waarden (effekt-dosis voor 50% der organismen) van Chlamydomonas reinhardi en Scenedesmus opoliensis voor de produkten: PMU, PZU, lissapol NX, ethomeen S25, diquat en 2,4-D.

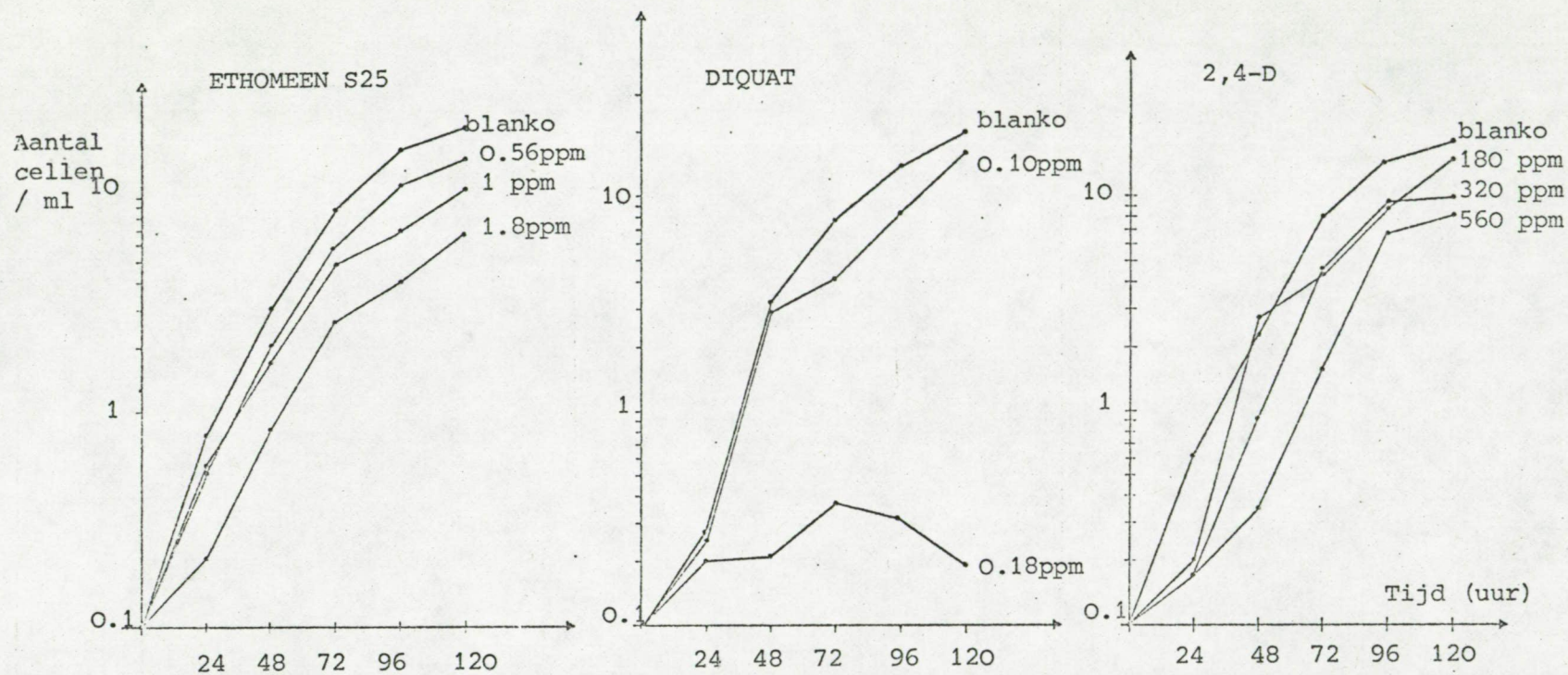
5.2.6. Bespreking van de resultaten

1) Beide methoden gebruikt voor het berekenen van de ED_{50} -waarde, enerzijds gesteund op de integraal van de groeikurve, anderzijds gesteund op de eindconcentratie van de wierpopulatie, geven omzeggens identieke resultaten. Hieruit kan men afleiden dat de uitgeteste produkten geen "eigenaardig effekt" hebben op de wiergroei, m.a.w. de remming gebeurt vanaf de start op een konstante manier (zie Figuren 27 tot 30). Er zijn geen "shock"-effekten en geen effekten die zich slechts na een paar dagen manifesteren.

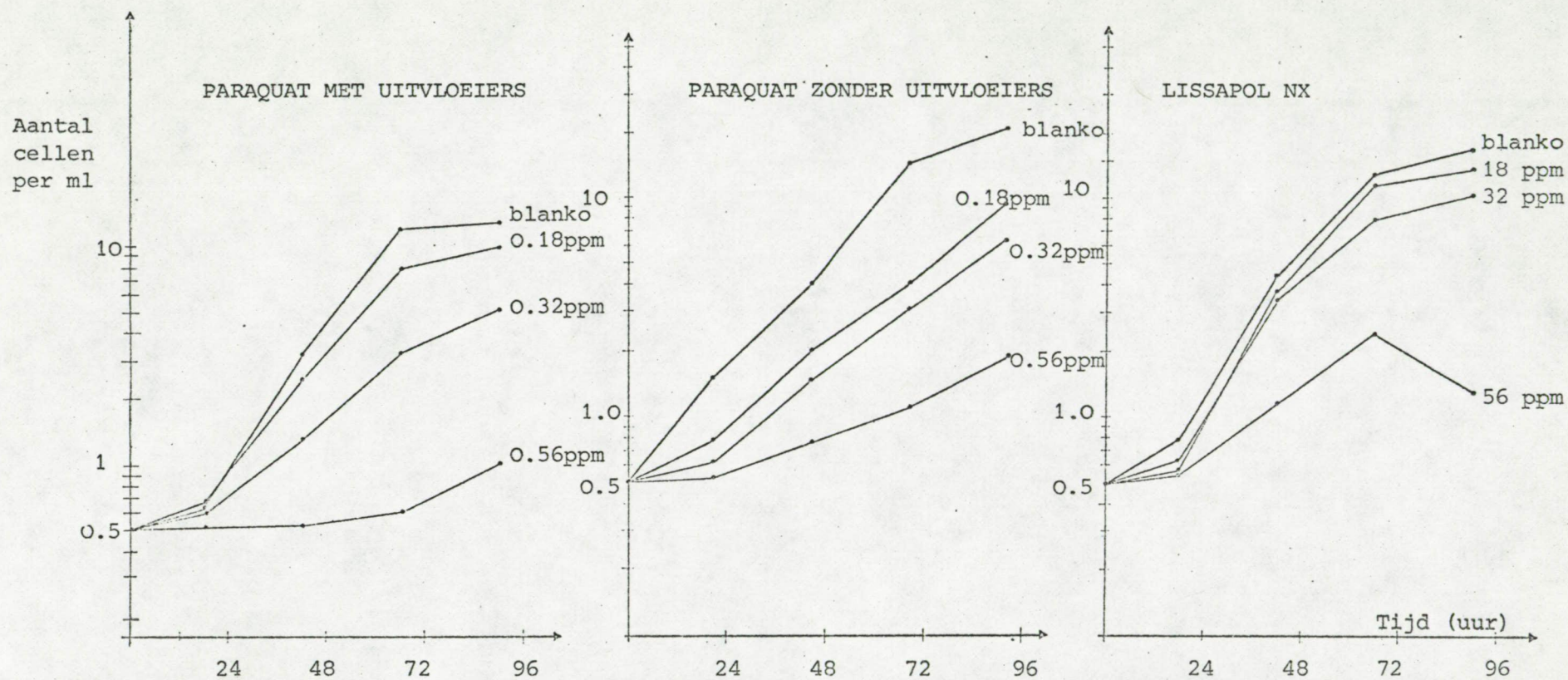
2) De resultaten voor beide uitgeteste wiersoorten zijn parallel. Chlamydomonas reinhardi is ongeveer 2.5x gevoeliger dan Scenedesmus opoliensis, althans voor de herbiciden, niet voor de twee detergenten (waar de resultaten in dezelfde grootteorde liggen).



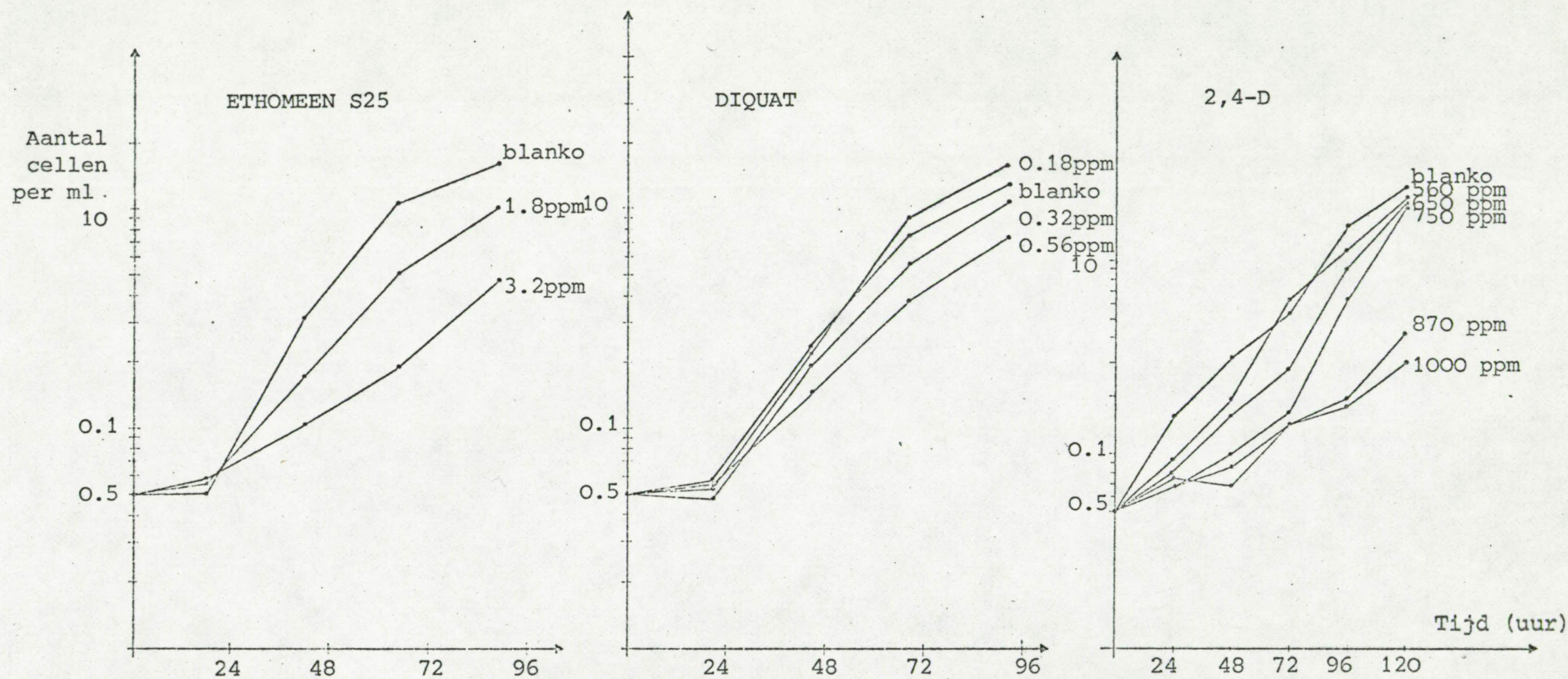
Figuur 28 : Experimentele groeikurven van *Chlamydomonas reinhardtii* in verschillende concentraties PMU, PZU en lissapol NX.



Figuur 29 : Experimentele groeikurven van *Chlamydomonas reinhardi* in verschillende concentraties ethomeen S25, diquat en 2,4-D.



Figuur 30 : Experimentele groeikurven van *Scenedesmus opoliensis* in verschillende concentraties PMU, PZU en lissapol NX.



Figuur 31 : Experimentele groeikurven van *Scenedesmus opoliensis* in verschillende concentraties ethomeen S25, diquat en 2,4-D.

De volgorde in effect (van het meest toxische naar het minst toxische produkt) is :

PZU \approx diquat \approx PMU > ethomeen S25 >> lissapol NX >> 2,4-D

PZU > PMU > diquat > ethomeen S25 >> lissapol NX >> 2,4-D

Voor Chlamydomonas reinhardi is het effect van PMU, diquat en PZU vrijwel ekwivalent en zijn de drie produkten efficiënte herbiciden (50% groeivermindering bij $+100$ ppb). Een drie maal hogere dosis PZU remt de groei van Scenedesmus opoliensis in een gelijke mate.

PMU en diquat zijn minder efficiënt, terwijl 2,4-D voor beide wiersoorten als een inactief herbicide kan worden bestempeld.

3) Het is vernoemenswaard dat PZU toxischer is voor Scenedesmus dan PMU. Dit is ook (zij het minder uitgesproken) het geval voor C. reinhardi. Nochtans werd de uitvloeier in de commerciële formulering aan het herbicide toegevoegd om de werking van het herbicide te verhogen. De verklaring hiervoor is ons insziens de volgende :

De herbicide werking wordt bij hogere planten, waarvan de bladeren bedekt zijn met een waslaag, verhoogd, doordat de tensio-actieve uitvloeier met het lipofiele uiteinde naar de waslaag gericht is en met het hydrofiel uiteinde naar het herbicide, wat een groter contact blad/herbicide voor gevolg heeft (zie 6.2. tot 6.4.). In het geval van de hydrofiele wiercellen zal de uitvloeier met het hydrofiel uiteinde naar de celwand gericht zijn ; de lipofobe uiteinden vormen bijgevolg een scherm tegen het hydrofiele herbicide waardoor de toxiciteit van het totaal produkt kan verlaagd worden.

4) De uitvloeiers op zichzelf (vnl. ethomeen S25) zijn ook niet volledige onschadelijk voor de plantaardige cellen, (niet zozeer voor Chlamydomonas reinhardi dan wel voor Scenedesmus opoliensis). Bij deze laatstgenoemde soort reduceert 1 ppm van dit produkt de wiergroei reeds met $+ 50\%$. Lissapol NX is ongeveer 30 maal inactiever.

Terwijl op algemeen toxikologisch vlak de herbiciden veel minder giftig zijn dan de insecticiden, ligt het voor de hand dat deze produkten wel een groter effect hebben op wieren dan de meeste andere agrochemikaliën.

Het effect van dergelijke produkten op fytoplankton werd reeds vroeger bestudeerd. BRINGMANN & KUHN (1959) hebben 48 organische produkten op Scenedesmus sp. uitgetest en vonden een minimale effect-dosis variërend tussen 640 en 0.1 ppm. Drie herbiciden simazin, amitrol en monuron hebben een minimaal effect-dosis (dit is de minimale dosis waarbij een effect wordt waargenomen) voor Scenedesmus quadricauda van respectievelijk 2.0, 1.0 en 0.5 ppm (SCHLÜTER, 1966). Ook andere eencellige wiersoorten zijn specifiek gevoelig voor herbiciden zoals fenuron, neburon, monuron en diuron (UKELES, 1962).

MALONEY & PALMER (1956) hebben o.a. een kwaternair ammoniumderivaat (van de groep gebruikt voor wierbestrijding in koeltorens en zwembaden) uitgetest op twee Chlamydomonas-soorten en twee Scenedesmus-soorten. De minimaal effect-dosis van dit algicide was voor deze soorten 0.500 à 0.250 ppm. Met 2,4-D werd daarentegen zowel bij Chlamydomonas sp. als bij Scenedesmus sp. nog geen groeiïnhibitie waargenomen bij een dosis van 1 en 5 ppm (PILLAY & TCHAN, 1972).

Uit een reeks van 21 herbiciden zijn diquat en paraquat de meest actieve componenten die de groei van het groenwier Chlorella pyrenoidosa inhiberen (min. effect-dosis van beiden 0.1 ppm). Eén ppm 2,4-D heeft geen inhiberend effect op deze soort (THOMAS et al., 1973).

Voor sommige mariene eencellige wieren zijn paraquat en diquat minder efficiënt ; voor sommige soorten hebben zij slechts een ED₅₀-waarde vergelijkbaar met deze van 2,4-D (Tabel 11 naar WALSH, 1972). In elk geval is diquat een zwakker algicide dan paraquat.

Tabel 11 : ED₅₀-waarden van 4 mariene eencellige wiersoorten voor 2,4-D, paraquat en diquat (naar WALSH, 1972).

	ED ₅₀ (ppm)		
	2,4-D	paraquat	diquat
<u>Chlorococcum</u> sp.	50	50	200
<u>Dunaliella tertiolecta</u>	75	20	30
<u>Isochrysis galbana</u>	50	5	15
<u>Phaeodactylum tricornutum</u>	50	10	15

Voor de zoetwaterwiersoorten Coelastrum microporum, Bracteacoccus cinnabannus en Anacystis nidulans (VOIGHT & LYNCH, 1974) liggen de ED_{50} -waarden voor 2,4-D in dezelfde range als de resultaten van WALSH (op.cit.) nl. tussen 30 en 70 ppm. Bij elk van deze wiersoorten is er een duidelijk effect op de pigmentatie van de cellen waar te nemen. Er is een verhoogde pigmentproduktie (hoofdzakelijk groen ; in het geval van Bracteacoccus : groen-geel tot oranje).

Additie van diquat aan een Scenedesmus-suspensie in het licht, veroorzaakt een lipiden-peroxidatie en een vermindering van het chlorofyl_a-gehalte. De hoeveelheid chlorofyl_b daarentegen blijft vrij konstant (VAN RENSEN, 1975). Door het voorkomen van dit peroxidatieverschijnsel in zuurstofrijk milieu, heeft men argumenten om aan te nemen dat het werkingsmechanisme van de dipyridyliumherbiciden paraquat en diquat voor hogere planten, zoals beschreven in Hoofdstuk 4.1.2., ook geldt voor sommige mikroalgen als Scenedesmus.

Indien de "difference factor" volgens HOLLISTER & WALSH (1973), zijnde de verhouding tussen de grootste en de kleinste ED_{50} -waarde met verschillende wiersoorten voor een bepaald produkt wordt berekend, verkrijgt men voor onze twee betrokken test-species volgende getallen in Tabel 12 :

Tabel 12 : "Difference factor" tussen de resultaten bekomen met C. reinhardi en S. opoliensis berekend volgens HOLLISTER & WALSH (1973) :

	<u>PMU</u>	<u>PZU</u>	<u>lissapol</u>	<u>ethomeen</u>	<u>diquat</u>	<u>2,4-D</u>
Integraal	2.86	3.30	1.24	1.21	4.33	2.62
Eindkoncentratie	2.85	3.00	1.59	1.53	4.73	1.74

Uit Tabel 12 blijkt dat Scenedesmus opoliensis gemiddeld 1.5 à 3x minder gevoelig is dan Chlamydomonas reinhardi voor paraquat en zijn uitvloeiers (zowel afzonderlijk als in combinatie).

Niettegenstaande de reeds zeer lage ED_{50} -waarde van Scenedesmus voor diquat, is Chlamydomonas nog 4.5x meer gevoelig voor dit produkt. De groeistof 2,4-D is het enige van de uitgeteste herbiciden waarbij de "difference factor" sterk verschilt naargelang deze berekend wordt aan de hand van de

ED₅₀-waarden op basis van de eindconcentratie en deze op basis van de integraal. Dit wordt veroorzaakt door het feit dat, in tegenstelling met de meeste andere gevallen, de ED₅₀-waarde voor Chlamydomonas berekend op basis van de integraal 25% lager ligt dan deze berekend op basis van de eindconcentratie. In dit verband kan men uit Figuur 28 vaststellen dat het effect van 2,4-D op C. reinhardi verschilt van het effect van de andere uitgeteste herbiciden op deze wiersoort en op S. opoliensis. De groei van de wierpopulatie wordt namelijk niet gelijkmatig (met verloop van de tijd) geremd. Men kan de volgende stadia onderscheiden : met stijgende concentraties van 2,4-D wordt de aanloopfase verlengd. Wat de exponentiële groeifase betreft kan men vaststellen dat voornamelijk in de laagste concentraties 2,4-D de populatiegroei groter is dan in de blanco-opstelling (cfr. richtingskoëfficiënt). In deze specifieke groeifase hebben de wiercellen in 2,4-D-gehalten van 560 tot 180 ppm een hogere delingssnelheid dan in de blanco.

De variaties op de "difference factors" tussen de verschillende produkten en voor 2,4-D naargelang het gebruikte criterium, leiden inderdaad tot de konklusie van HOLLISTER & WALSH (op.cit.) :

"It is necessary, therefore, to use several species from each of several families in algal bioassay studies, to obtain realistic data concerning effects of herbicides on algae".

5.3. Toxiciteitsonderzoek op ciliaten

5.3.1. Inleiding

Lagere organismen zijn meestal veel gevoeliger voor veranderingen in hun omgeving dan de meeste hogere organismen. BURBANCK & SPOON (1967) formuleren dit als volgt : "Both phytoplankton and Protozoa include unicellular organisms which would be among the first to be affected by contamination of an aquatic ecosystem since they have only a plasma membrane and a permeable outer covering between their living cytoplasm and their environment". Over de Protozoa zegt NOLAND (1925)

(in BURBANK & SPOON, op.cit.) bovendien : "There are few organisms that come in closer contact with their surroundings". Bij het gebruik van Protozoa voor toxikologisch onderzoek, moet men derhalve zeer goed rekening houden met het feit dat de organismen niet alleen reageren op de aanwezigheid van een toxische stof, maar evengoed op de minste verandering van de proefomstandigheden.

Het onderzoek in verband met het opstellen van een gestandaardiseerde reproduceerbare bioassay met Protozoa, meer bepaald met ciliaten, is nog niet ver gevorderd. Citeren we experimenten met Tetrahymena pyriforma en Tetrahymena vorax (COOLEY, 1954 ; COOLEY, KELTNER & FORESTER, 1972, 1973 ; WEST, BARBERA, KOLAR & MURRELL, 1962 ; TINGLE, PAVLAT & CAMERON, 1973 ; THRASHER & ADAMS, 1972 en MORGAN, 1972). Methodologisch zijn al deze testen vrijwel identiek. De ciliaten worden axenisch gekweekt bij $\pm 26^{\circ}\text{C}$ in een medium van 0.1% (W/V) "dehydrated yeast extract", 2% (W/V) proteose peptone en 0.5% (W/V) glucose. Het criterium voor toxiciteit is de populatiegroei waarbij de concentratie van de organismen wordt bepaald aan de hand van de optische densiteit van de kulturen bij 540 nm.

MORGAN (1972) en THRASHER & ADAMS (1972) daarentegen bepaalden de celconcentratie door kleuring met I_2 -KI oplossing en telling van de cellen.

Ook de proeven van UKELES (1970) met Chilomonas paramecium werden uitgevoerd met kolorimetrische aflezing bij 420 nm.

Voor andere ciliaten-soorten vindt men slechts sporadische gegevens ; een bioassay werd beschreven met Microregma heterostoma met als criterium de opnamesnelheid van het voedselorganisme Escherichia coli (BRINGMANN & KÜHN, 1959). DIVE (1973) beschreef een uitstekende test met Colpidium, eveneens gevoed met E. coli ; het criterium was het aantal ciliaten na een bepaalde testduur. WEST, BARBERA, KOLAR & MURRELL (1962) ontworpen een speciaal type bioassay waarbij de soorten Crithidia fasciculata, Ochromonas malhamensis, Tetrahymena pyriformis en Trichomonas foetus werden gekweekt op een agarlaag. Alle voornoemde proeven zijn axenisch.

Bioassays met ciliaten in niet-axenisch midden gebeuren veelal met mengkulturen (BURBANCK & SPOON, 1967 ; RUTHVEN & CAIRNS, 1973). Enkele uitzonderingen van niet-axenische testen met reinkulturen zijn de testen van GREGORY, REED & PRIESTER (1969), die DDT en parathion uittestten op een reinkultuur van Paramecium bursaria en Paramecium multimicronucleatum ; en ten slotte de proeven van PERSOONE & UYTENDIJK (1975) die de invloed nagingen van Pb^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , DDT, DDE, hexachloor benzeen, heptachloor, hexachlorocyclohexaan en arochlor ^R1254 op Euplotes vannus.

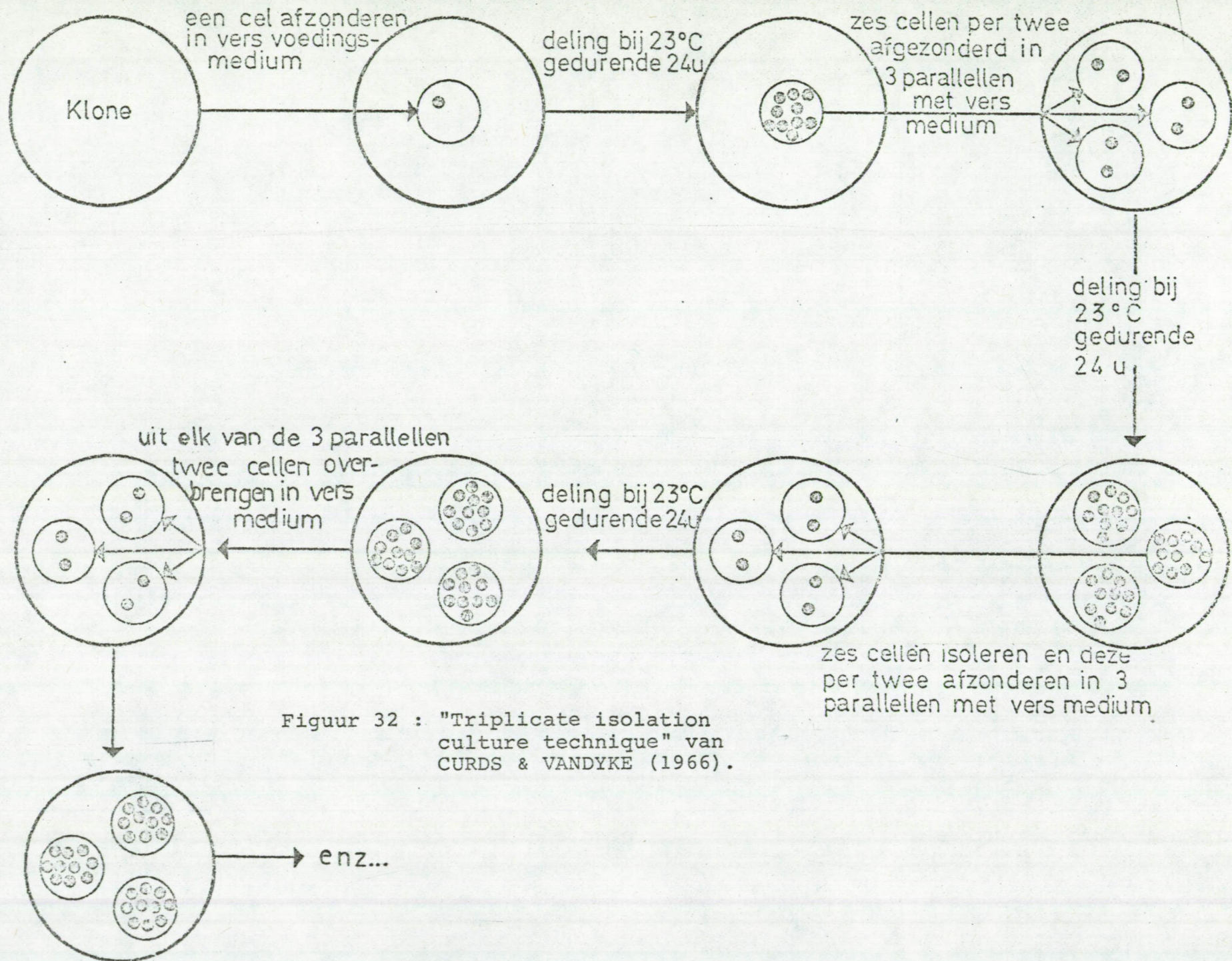
In het kader van onze toxiciteitstesten met herbiciden hebben wij gepoogd een eigen bioassay-techniek op punt te stellen voor ciliaten. Als testprodukt werd het herbicide 2,4-D (triethanolaminezout) uitgekozen.

5.3.2. Gegevens over gebruikte soort

Als testorganisme voor het toxiciteitsonderzoek werd de hypotriche ciliaat Stylonychia mytilus EHRENBERG uitgekozen. Deze soort is een typische vertegenwoordiger van de aquatische mikrofauna. Deze grote ciliaat (100-300 μm) werd geïsoleerd uit een planktonstaal van een vijver uit de universitaire plantentuin te Gent, en werd gedetermineerd door Prof. PERSOONE.

5.3.3. Opsporen van geschikte cultuurmedia en voeding voor Stylonychia mytilus

In het genomen planktonstaal voedde Stylonychia mytilus zich hoofdzakelijk met de sferische Spirogyra-sporen die het merendeel van de fytoplankton-biomassa uitmaakten. Wat betreft de partikelgrootte voldoet het eencellig groenwier Chlamydomonas reinhardtii als levend voedsel voor deze ciliaten. Een reeks van proeven werden uitgevoerd om de geschiktheid van dit wier als voedsel voor Stylonychia aan te tonen.



Figuur 32 : "Triplicate isolation culture technique" van CURDS & VANDYKE (1966).

Er werden ook proeven uitgevoerd met door ultrason-
golven gedode C. reinhardi-cellen, met drooggewalste Scenedes-
mus acutus-cellen(1) en gedroogde bakkersgist (2).

Metodiek

Al de proeven werden verricht in polystyreen kuvet-
ten (3) met een diameter van 15 mm en een inhoud van 0.2 ml,
bij $23 \pm 1^\circ\text{C}$ onder konstante belichting met 2 TL-lampen van 65
Watt op een afstand van ± 25 cm. De geïnkuleerde platen,
elk met 8 kuvetten, werden in petriplaten geïnkubeerd, op
vochtig filtreerpapier, om de verdamping tot een minimum te
beperken.

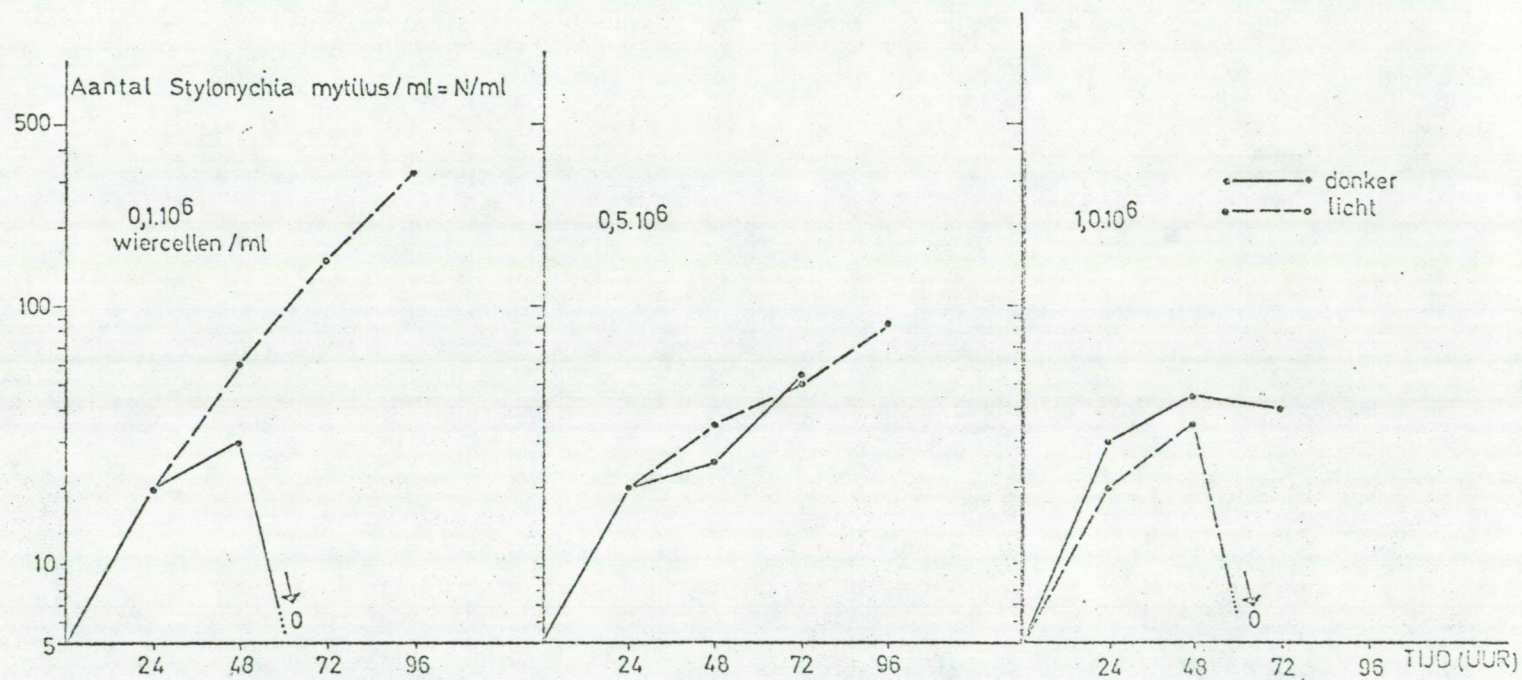
Per kuvet werd 0.2 ml medium gebruikt waarin één
ciliaat werd geënt. Voor elke proef werden 48 of 60 parallel-
len opgesteld, waarvan elke dag gedurende een periode van 4 of
5 dagen, een reeks van 12 parallellen met BOUIN-oplossing wer-
den gefixeerd en geteld.

Voor "long-term"-experimenten werd de "triplicate
isolation culture technique" van CURDS & VANDYKE (1966) ge-
bruikt met twee ciliaten per kuvet (zie Figuur 32). Omdat de
delingssnelheid van S. mytilus kleiner is dan deze van de ci-
liaten die door CURDS & VANDYKE werden gebruikt, wijzigden we
de methode van laatstgenoemde auteurs door het overbrengen van
de ciliaten van het oud naar het vers medium slechts om de 2,
3, 4 of 5 dagen uit te voeren i.p.v. dagelijks. Gezien de
duur van een proef in totaal 10-12 dagen bedroeg werden de
kulturen die om de 2 dagen werden overgeënt in totaal 4 maal
ververst, de kulturen die om de 3 dagen werden overgeënt, in
totaal 3 maal, de 4 dagen oude kulturen 2 maal en de 5 dagen
oude kulturen slechts één maal (zie Figuur 32bis).

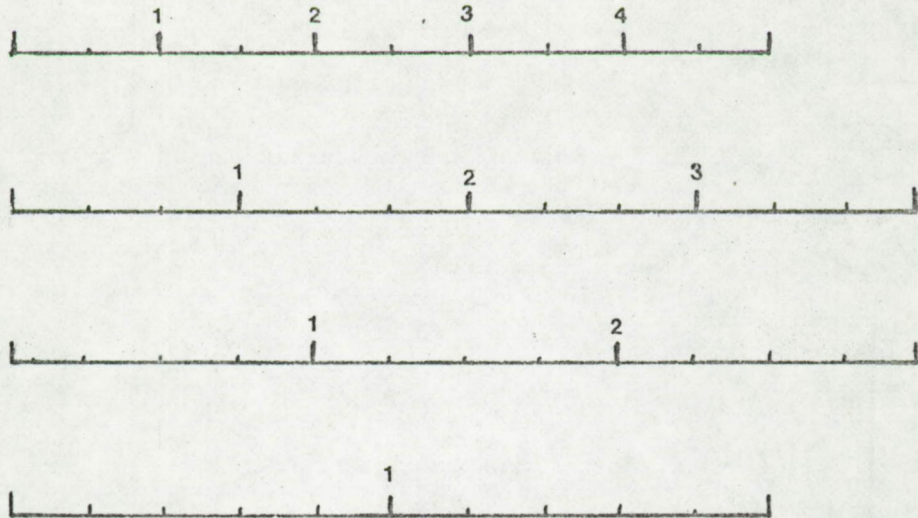
(1) Kohlenstoffbiologische Forschungsstation, Dortmund, Duitsland.

(2) Fleishmann's active dry yeast, Mfd by Standard Brands Inc., N.Y.,
10022, USA.

(3) Kartell cuvettes TS 357.



Figuur 33 : Populatiegroei van *Stylonychia mytilus* met verschillende concentraties van *Chlamydomonas reinhardtii*.



Figuur 32bis : "Triplicate isolation culture technique" :
frequentie en aantal verversingen.

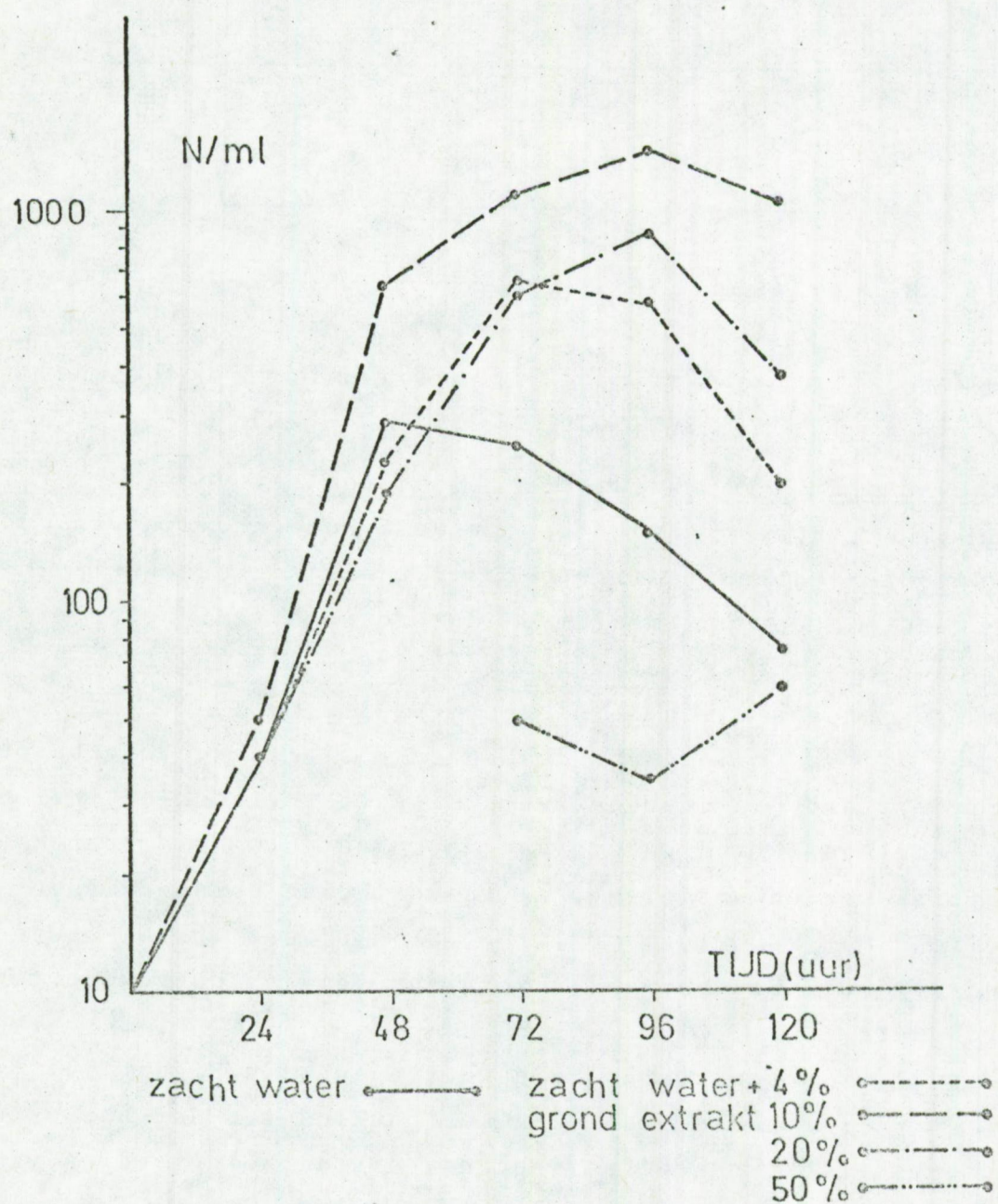
Proeven met *C. reinhardi* als levend voedsel voor *S. mytilus*

Vooreerst werd de optimale concentratie van de *Chlamydomonas*-suspensie uitgetest. Dergelijke testen zijn niet eenvoudig omdat het medium en de proefomstandigheden niet alleen de populatiegroei van de ciliaten beïnvloedt, maar ook de groeisnelheid van de wieren bepaalt.

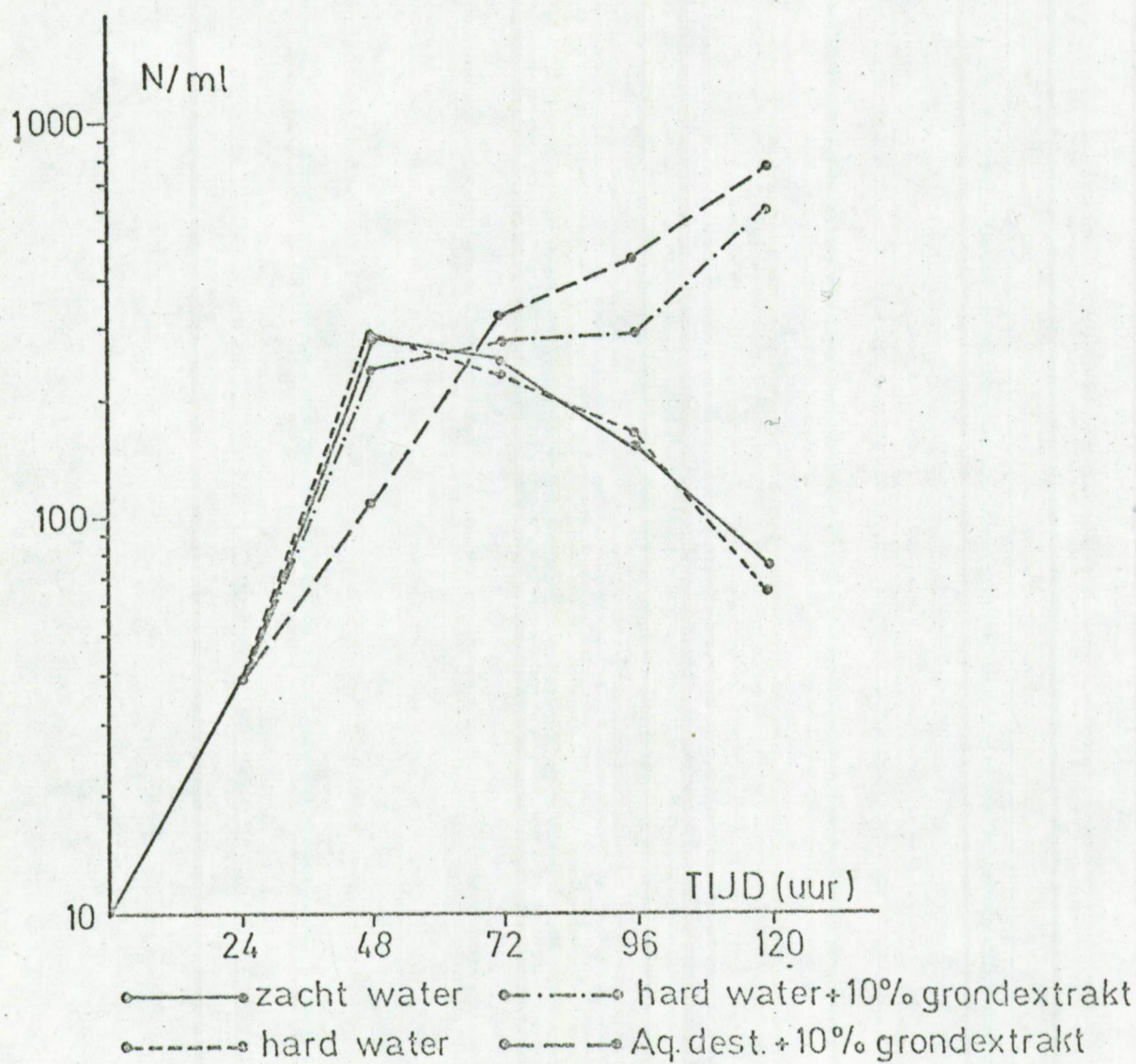
De invloed van de concentratie van de wiersuspensie bij de start van de proef werd uitgetest alsook de invloed van belichtingsomstandigheden van de kulturen. Drie startconcentraties werden uitgetest, a) in volledige duisternis en b) belicht met 2000 lux : 0.1×10^6 , 0.5×10^6 en 1.0×10^6 wiercellen/ml. De proeven werden verricht volgens de gewone testprocedure.

De resultaten zijn weergegeven in Figuur 33.

Uit deze proef kan men konkluderen dat het onrechtstreeks effect van de belichting, via de beïnvloeding van zowel de groei als de konditie van de wieren, het kleinst was bij een startconcentratie van 0.5×10^6 wiercellen/ml. Een concentratie van 1.0×10^6 wiercellen/ml was reeds vanaf 48 uur ongunstig voor de ciliaten en een concentratie van 0.1×10^6 wiercellen/ml was slechts geschikt mits een sterke belichting waardoor de wierconcentratie steeg.



Figuur 35 : Populatiegroei van *Stylonychia mytilus* in zacht water met verschillende concentraties bodemextract.



Figuur 34 : Populatiegroei van Stylonychia mytilus in verschillende media.

Alle volgende experimenten met C. reinhardi als levend voedsel voor S. mytilus, werden bijgevolg uitgevoerd met een startconcentratie van 0.5×10^6 wiercellen/ml, en met een matige, continue belichting (2 TL-lampen van 65 Watt op een afstand van 25 cm).

Voor het opsporen van het effect van de samenstelling van het medium op de populatiegroei van S. mytilus werden 4 verschillende artificiële zoetwaters vergeleken :

zacht artificieel zoetwater volgens de formule van

CAIRNS (1969)

hard artificieel zoetwater volgens de formule van

CAIRNS (op.cit.)

aq.dest. + 10% bodemextrakt volgens FÖYN (1934)

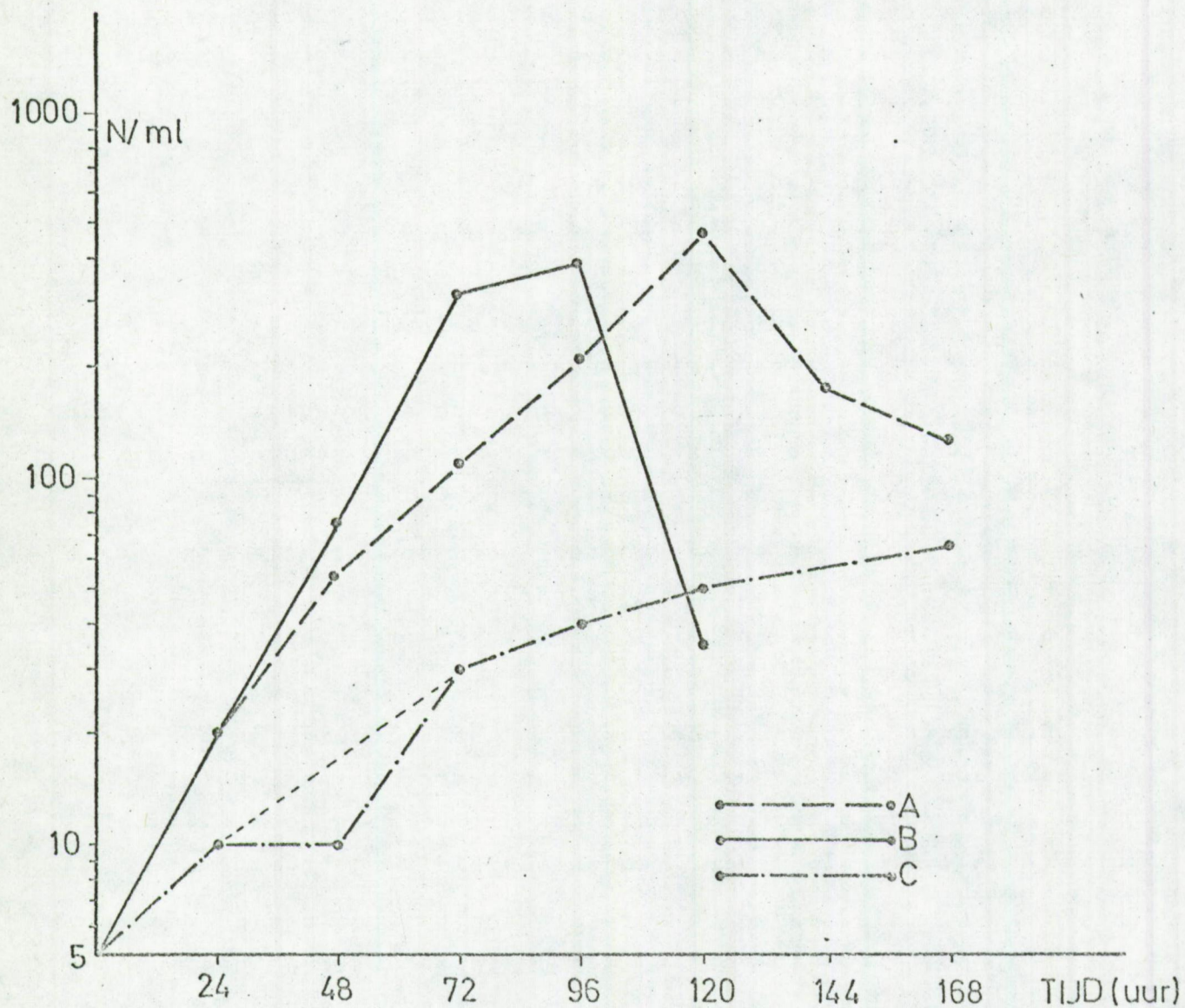
hard water volgens CAIRNS + 10% bodemextrakt.

De resultaten, weergegeven in Figuur 34, tonen duidelijk de gunstige invloed aan van het bodemextrakt, in het bijzonder na een paar dagen groei van de populatie. Er kan geen onderscheid gemaakt worden tussen de resultaten bekomen met hard en met zacht water volgens CAIRNS.

In een volgende proef werd de optimale concentratie bodemextrakt uitgetest. Het basis medium is zacht water waaraan 4%, 10%, 20% en 50% bodemextrakt werd toegevoegd.

Figuur 35 geeft de resultaten van deze proef weer : Een additie van 10% bodemextrakt gaf duidelijk de beste resultaten : na 96 uur was het aantal ciliaten 1400/ml. Dit is een veel beter resultaat dan dit vermeld door LICHTENBERG (1954), die als levend voedsel Colpidium gebruikte.

Indien we onze resultaten toetsen aan de theorie van FENCHEL (1968) in verband met de reproductie-potentiaal van ciliaten, dan blijkt dat een generatietijd van 8.0 uur (resultaat dat wij bereikten in zacht water volgens CAIRNS + 10% bodemextrakt, en met 0.5×10^6 Chlamydomonas-cellen/ml) als een rekordtijd kan beschouwd worden voor een cilium van die afmetingen.



A: gedroogd Scenedesmuspoeder 0,08 g/l

B: gedroogde gist 0,02 g/l

C: met Ultrason gedode Chlamydomonas $0,75 \cdot 10^6$ cellen/ml
+ gedroogde gist 0,01 g/l

Figuur 36 : Populatiegroei van Stylonychia mytilus met verschillende "inerte" voedselbronnen.

Proeven met inerte voedselbronnen voor *S. mytilus*

Eén van de eerste vereisten van een reproduceerbare bioassay is dat, indien niet kan vermeden worden de testorganismen te voeden gedurende de proef, het gebruik van levend voedsel in elk geval zoveel mogelijk moet vermeden worden.

We hebben dan ook, met de resultaten van vorige proef als basis, een reeks alternatieve voedselbronnen uitgetest, telkens met zacht water + 10% bodemextract als medium. Voor deze proeven werd de gemodificeerde methode van CURDS & VANDYKE (op.cit.) gebruikt.

De gebruikte voedselbronnen zijn :

- diepgevroren (-16°C gedurende 3 dagen) Chlamydomonas reinhardi-cellen (0.75×10^6 cellen/ml)
- door 3 minuten behandeling met Ultrasongolven gedode C. reinhardi-cellen (0.75×10^6 cellen/ml)
- door Ultrasongolven gedode C. reinhardi-cellen (0.75×10^6 cellen/ml) + 0.01 g/l gedroogde gistcellen (Saccharomyces cerevisiae)
- gedroogde gistcellen (0.02 g/l)
- drooggewalste Scenedesmus acutus-cellen (0.08 g/l).

De resultaten zijn weergegeven in Figuur 36.

Bij gebruik van gedode C. reinhardi-cellen, werden slechte resultaten bekomen. Bovendien kon men in de ciliatenkulturen kannibalistische vormen van S. mytilus onderscheiden.

Met S. acutus deelden de ciliaten zich gedurende 6 dagen tot een densiteit van 1000 organismen/ml was bereikt. Daarna nam de populatie in aantal af.

Gedroogde gist geeft in de gebruikte concentratie zeer goede resultaten. In de eerste 3 dagen van de test zijn de resultaten beter met gedroogde gist dan met gedroogde Scenedesmus, doch vanaf de 4de dag blijkt de gebruikte gistconcentratie in deze proefomstandigheden niet meer geschikt om de Stylonychia-kultuur te onderhouden.

Samenvattend kan men stellen dat de hypotriche ciliaat S. mytilus met succes kan gekweekt worden op C. reinhardi (0.5×10^6 cellen/ml) in zacht water volgens CAIRNS + 10% bodemextract.

Met het oog op de bioassays werd een minder gunstig doch noodzakelijk alternatief gezocht met inert voedsel :
Op korte termijn (3 dagen) geeft gedroogde gist goede resultaten. Drooggewalste Scenedesmus acutus-cellen zijn geschikt voor het onderhouden van de stockkulturen en voor de testen van langere duur.

5.3.4. Bioassay-techniek

De proeforganismen werden genomen uit kulturen die reeds geruime tijd gekweekt werden met inert voedsel : enerzijds gedroogde bakkersgist van FLEISHMANN (0.02 g/l), anderzijds Scenedesmus-poeder (0.08 g/l).

Als medium werd artificieel zoetwater van CAIRNS (op.cit.) gebruikt.

Alle testen werden gedaan bij $23^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ onder konstante belichting met 2 TL-lampen (65 Watt) op ± 25 cm afstand. De bioassay met S. mytilus werd alleen uitgevoerd met het herbicide 2,4-D.

De opstelling van de bioassay gebeurde volgens het schema van CURDS & VANDYKE (1965) (zie Figuur 32).

Zoals reeds vermeld werd als herbicide alleen het 2,4-D uitgetest, in een concentratie-interval van 10 tot 240 ppm.

Vijf ml van de verschillende verdunningen van 2,4-D werden in kleine glazen petrischaaltjes (diameter 5 cm) gebracht. Per verdunning werden er drie parallellen gebruikt. Elk van de schaaltes werd geënt met 2 ciliaten. Om de 72 uur werd het aantal ciliaten bepaald, en werden de kulturen overgeënt. In totaal werden de kulturen 4 maal ververs.

Bij het einde van de proef, na 5x72 uur, hadden we aldus per concentratie 5 reeksen van 3 aantallen ciliaten. Deze 5 groepen cijfers werden strikt uit elkaar gehouden, omdat de omstandigheden waarin de achtereenvolgende proeven gebeurden niet steeds konstant waren, en er bijgevolg verschillen in absolute aantallen optraden. Naar het voorbeeld van GENERMONT (1969) werden deze aantallen eerst in aantal genera-

	1			2			3			4			5			6		
blanko	35	15	24	50	50	29	40	20	62	42	29	60	85	125	93	40	35	167
10 ppm	13	23	16	19	36	40	38	60	32	39	44	33	67	93	58	77	126	75
32 ppm	25	21	23	30	23	20	28	50	39	13	18	26	30	30	30	55	34	25
56 ppm	7	17	14	16	10	11	36	20	12	9	7	5	7	14	9	31	11	17
75 ppm	12	16	11	31	20	15	18	14	32	13	12	15	13	27	14	38	16	10
100 ppm	9	13	20	19	13	12	16	24	16	4	2	4	14	13	14	18	16	10
135 ppm	-	-	-	-	-	-	0	8	16	0	0	3	0	10	4	14	20	17
180 ppm	1	0	5	0	0	0	2	0	10	0	0	0	2	13	24	11	12	23
210 ppm	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0	7	0	0
240 ppm	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabel 13: Bioassay met 2,4-D op Stylonychia mytilus gevoed met 0.02 g/l gedroogde bakkersgist.

Absolute aantallen na 72 uur in de kuvetten in functie van de concentratie 2,4-D gedurende de 6 opeenvolgende proeven.

	1			2			3			4			5			6		
blanko	5	3	4	5	5	4	5	4	5	5	4	5	6	6	6	5	5	7
10 ppm	3	4	3	4	5	5	5	5	4	5	5	5	6	6	5	6	6	6
32 ppm	4	4	4	4	4	4	4	5	5	3	4	4	4	4	4	5	5	4
56 ppm	2	4	3	3	3	3	5	4	3	3	2	2	2	3	3	4	3	4
75 ppm	3	3	3	4	4	3	4	3	4	3	3	3	3	4	3	5	4	5
100 ppm	3	3	4	4	3	3	3	4	3	1	0	1	3	3	3	4	3	3
135 ppm	-	-	-	-	-	-	0	2	3	0	0	1	0	3	1	3	4	4
180 ppm	0	0	2	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	3	4	3	3	4
210 ppm	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0	2	0	0
240 ppm	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

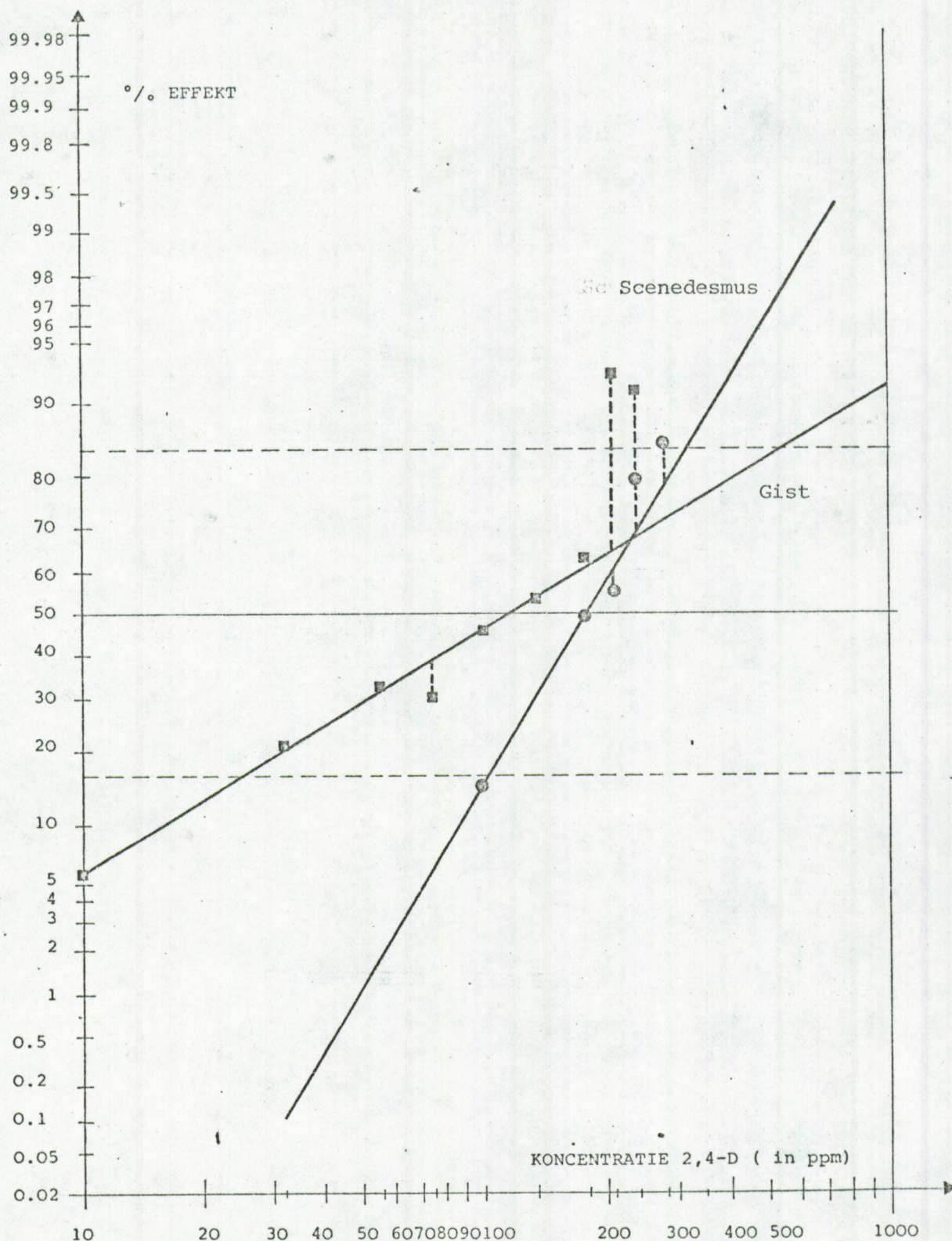
Tabel 14: Bioassay mt 2,4-D op Stylonychia mytilus gevoed met 0.02 g/l gedroogde bakkersgist.

Aantallen na 72 uur uitgedrukt in aantal generaties.

.	1	2	3	4	5	6	\bar{x}	V	s	VC
blanko	100	100	100	100	100	100	100	-	-	-
10 ppm	80	100	100	100	100	86	94.3	80.7	9.0	10
32 ppm	80	80	100	80	67	71	79.7	129.9	11.4	14
56 ppm	80	60	100	60	50	57	67.8	348.2	18.7	28
75 ppm	60	80	80	60	67	71	69.7	81.9	9.1	13
100 ppm	80	40	80	20	50	57	54.5	545.5	23.4	43
135 ppm	-	-	60	20	50	57	46.8	335.6	18.3	39
180 ppm	40	0	60	0	67	57	37.3	915.1	30.3	81
210 ppm	0	0	-	-	0	29	7.3	210.3	14.5	200
240 ppm	0	0	-	-	-	-	0	-	-	-

Tabel 15: Bioassay met 2,4-D op Stylonychia mytilus gevoed met 0.02 g/l gedroogde bakkersgist.

Per proef is de hoogste waarde van het aantal generaties na 72 uur uitgedrukt als % t.o.v. de hoogste waarde van de respektievelijke blanko. Van deze procenten is het gemiddelde berekend, de variantie, de standaard deviatie en de variatiekoëfficiënt.



Figuur 37 : Bioassay met 2,4-D met Stylonychia mytilus gevoed enerzijds met 0.02 g/l gedroogde bakkersgist en anderzijds met 0.08 g/l gedroogde Scenedesmus-cellen.
Bepaling van de ED₅₀-waarden met betrouwbaarheidsinterval volgens LITCHFIELD & WILCOXON (1948).

ties uitgedrukt. Deze werden als volgt berekend : als n het aantal ciliaten is na een bepaalde tijd, dan is : $2^x < n < 2^{x+1}$, waarbij x het aantal delingen is. In de meeste gevallen is $n > 2^x$, en is de $(x+1)$ de deling reeds aan de gang. Voor het aantal generaties wordt dan ook $(x+1)$ in beschouwing genomen.

Per proef werd volgens de theorie van PERSOONE & UYTTERSPROT (1975) telkens alleen de hoogste waarde uit de 3 parallellen in beschouwing genomen. Deze waarden werden uitgedrukt als procent t.o.v. hun respektievelijke blanco. Daarna werd het gemiddelde gemaakt van de aldus berekende procenten van de 5 of 6 opeenvolgende proeven (+ standaarddeviatie, variantie en variatiekoëfficiënt). Vervolgens werden de gegevens verder verwerkt volgens de methode van LITCHFIELD & WILCOXON (1948). Deze methode bestaat er in aan de hand van de methode van de kleinste kwadraten de meest waarschijnlijke rechte te trekken doorheen de reeks punten uitgezet op logaritmisch probabiliteitspapier.

5.3.5. Resultaten

Bioassay met 2,4-D-amine met Stylonychia mytilus gevoed met 0.02 g/l gedroogde bakkersgist in zacht water volgens CAIRNS

De resultaten van de vijf opeenvolgende tellingen om de 72 uur zijn in Tabel 13 weergegeven. Deze aantallen werden vervolgens omgerekend in aantal generaties (Tabel 14). Alleen de hoogste waarde van de drie parallellen werd in aanmerking genomen en deze waarden werden uitgedrukt als procent t.o.v. hun respektievelijke blanco (Tabel 15). Van deze procenten werd het gemiddelde, de standaarddeviatie en de variatiekoëfficiënt berekend. Tenslotte werden deze procenten omgezet in procent effekt en aan de hand van deze cijfers werd de ED_{50} -waarde berekend volgens de werkwijze van LITCHFIELD & WILCOXON (op.cit.) (zie Figuur 37). Deze bewerkingen gaven uiteindelijk volgende waardecijfer :

$$ED_{50} + \text{betrouwbaarheidsinterval} = 118 (169-83) \text{ ppm}$$

$$\text{Richtingsfunctie ("Slope function")} + \text{betrouwbaarheidsinterval} =$$

	1			2			3			4			5		
blanko	28	29	32	115	93	132	155	178	122	109	125	39	37	44	32
10 ppm	23	27	29	66	89	82	178	152	121	68	98	66	40	38	20
100 ppm	7	10	8	74	93	66	125	58	96	34	29	73	13	22	32
180 ppm	5	3	4	24	18	13	22	10	26	14	4	10	6	2	4
210 ppm	2	5	5	26	27	31	0	5	14	7	7	8	6	6	0
240 ppm	2	0	4	8	7	0	1	0	0	9	6	7	0	0	0
280 ppm	4	0	0	0	0	0	0	0	0	11	6	6	0	0	0

Tabel 16: Bioassay met 2,4-D op Stylonychia mytilus gevoed met 0.08 g/l gedroogde Scenedesmus-cellen .
Absolute aantallen na 72 uur in de kuvetten in funktie van de konzentratie 2,4-D gedurende de 5 opeenvolgende proeven.

	1			2			3			4			5		
blanko	4	4	4	6	6	7	7	7	7	6	6	5	5	5	4
10 ppm	4	4	4	6	6	6	7	7	6	6	6	6	5	5	4
100 ppm	2	3	2	6	6	6	6	5	6	5	4	6	3	4	4
180 ppm	2	1	1	4	4	3	4	3	4	3	1	3	2	0	1
210 ppm	0	2	2	4	4	4	0	2	3	2	2	2	2	2	0
240 ppm	0	0	1	2	2	0	0	0	0	3	2	2	0	0	0
280 ppm	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	2	0	0	0

Tabel 17: Bioassay met 2,4-D op Stylonychia mytilus gevoed met 0.08 g/l gedroogde Scenedesmus-cellen .
Aantallen na 72 uur uitgedrukt in aantal generaties.

	1	2	3	4	5	\bar{x}	V	s	VC
blanko	100	100	100	100	100	100	-	-	-
10 ppm	100	86	100	100	100	97.2	39.2	6.3	6
100 ppm	75	86	86	100	80	85.4	87.8	9.4	11
180 ppm	50	57	57	50	40	50.8	48.7	7.0	14
210 ppm	50	57	43	33	40	44.6	85.3	9.2	21
240 ppm	25	29	0	50	0	20.8	450.7	21.2	102
280 ppm	25	0	0	50	0	15.0	500.0	22.4	149

Tabel 18: Bioassay met 2,4-D op Stylonychia mytilus gevoed met 0.08 g/l Scenedesmus-poeder.
Per proef is de hoogste waarde van het aantal generaties na 72 uur uitgedrukt als % t.o.v. de respektievelijke blanko. Van deze % is het gemiddelde berekend, de variantie, de standaard deviatie en de variatiekoëfficiënt.

$$S = \frac{ED_{84}/ED_{50} + ED_{50}/ED_{16}}{2} = 4.65 \quad (9.44-2.29)$$

De "slope function" wordt gebruikt voor het berekenen van het betrouwbaarheidsinterval van de ED_{50} -waarde en wordt door LITCHFIELD & WILCOXON (op.cit.) als volgt gedefinieerd :

"This is the fold change in dose required to produce a unit standard deviation change in response along the line".

Bioassay met 2,4-D-amine met Stylonychia mytilus gevoed met 0.08 g/l gedroogde Scenedesmus-poeder in zachte CAIRNS

De proeven gebeurden in identiek dezelfde omstandigheden als voorgaande.

De resultaten zijn weergegeven in Tabel 16, 17 en 18 en Figuur 36 :

ED_{50} + betrouwbaarheidsinterval = 181 (223-147) ppm

Slope function + confidence limits = 1.76 (2.61-1.20)

5.3.6. Bespreking van de resultaten

Voor bioassays met ciliaten zal het altijd een moeilijke opdracht blijven gezien de korte generatietijd van deze organismen om proeven uit te voeren zonder voedsel toe te dienen ; anderzijds kan het toedienen van voedsel een belangrijke rol hebben op de toxiciteit. Onze proeven leveren hiervan het duidelijke bewijs :

In het geval van voeding met gist ligt de ED_{50} -waarde meer dan 50% hoger dan in het geval van voeding met Scenedesmus-poeder. De betrouwbaarheidsintervals overlappen elkaar nauwelijks.

Het mechanisme dat aan de basis ligt van deze verschillen konden we niet achterhalen. De organismen kunnen immers enerzijds verschillend reageren (etologisch) naargelang de aard van hun voedsel. Anderzijds kan de opname van het toxikans verschillen naargelang de aard van het voedsel ; de ab- en adsorptie van het produkt aan de voedselpartikels spelen hierin een belangrijke rol.

In dit hoofdstuk werd een methode vooropgesteld voor een reproduceerbare bioassay met ciliaten. De analyse van de resultaten gebeurde volgens de statistische methode van LITCHFIELD & WILCOXON (1948). Deze methode wordt praktisch in elk toxikologisch laboratorium toegepast, ten eerste omwille van de juiste wiskundige benadering, en ten tweede omwille van de zeer preciese methodiek, waardoor de techniek ook door niet getrainde personen makkelijk kan worden toegepast.

Er zijn evenwel een aantal voorwaarden aan verbonden, waardoor de toepassing voor toxiciteitsonderzoek op aquatische invertebraten, in tegenstelling met "dosis-effect"-experimenten op kleine zoogdieren wordt bemoeilijkt. In farmakologisch onderzoek is het normaal dat een reeks concentraties van het uit te testen produkt, een reeks antwoorden van het testorganisme geeft, gaande van 0 tot 100% effect, met verscheidene waarden tussen beide extremen gelegen. Bij invertebraten in het algemeen, en bij ciliaten hier in het bijzonder, is het daarentegen dikwijls zo, dat het merendeel van de testconcentratie ofwel 0% of 100% effect veroorzaken. Hoogstens 1 à 2 van de uitgeteste concentraties geven antwoorden gelegen tussen 0 en 100%. Alhoewel het logisch zou zijn een aantal concentraties uit te testen binnen de "critical range", waarbij men een groter aantal tussenliggende antwoorden kan verwachten, moet men er rekening mee houden, dat het antwoord van invertebraten veel minder gestandaardiseerd en te standardiseren is, dan dit van hogere organismen.

Door hun lage organisatiegraad zijn de individuele verschillen enerzijds veel groter en hebben de uitwendige proefomstandigheden anderzijds een zeer grote invloed op het dosis-effekt antwoord van de testorganismen. Dit wordt zeer duidelijk wanneer de proeven verscheidene malen herhaald worden.

Voor kleine organismen, zoals ciliaten, en voor ééncellige wieren, kan dit eerste bezwaar vermeden worden, door i.p.v. het antwoord van één individu, het antwoord van een volledige populatie te beschouwen. In de plaats van het reaktievermogen van één of meerdere organismen, speelt dan de gevoeligheid van een volledige populatie een rol. Deze gevoe-

ligheid is dan afhankelijk van het stadium in de populatie-groei. Doch verschillen alleen hieraan te wijten kunnen gemakkelijk vermeden worden door de stockkulturen steeds in dezelfde omstandigheden te houden en door de proeven steeds te starten met organismen uit een populatie in een welbepaalde groeifaze.

In de praktijk is men bij het gebruiken van een volledige populatie als testobject voor een toxiciteitstest, beperkt door a) de grootte van de organismen, b) de kweektechnologie en c) de duur van de proeven.

In de experimenten met S. mytilus werd telkens gestart met twee individuen. Hierdoor werden de verschillen tussen de parallellen te wijten aan individuele verschillen van de organismen slechts gedeeltelijk opgevangen. Aangenomen dat de proefomstandigheden voor alle parallellen dezelfde waren, kunnen deze verschillen tussen de parallellen alleen te wijten zijn aan een asynchrone deling van twee cellen afkomstig van eenzelfde moeder cel en een eventuele mortaliteit. Het hoogste resultaat geeft in elk geval de optimale groei weer in de gegeven omstandigheden (PERSOONE & UYTTERSROT, 1975).

Het tweede bezwaar dat hierboven werd aangehaald is de variatie in het antwoord van eencelligen als gevolg van schommelingen in de uitwendige factoren. Voor het reproduceerbaar maken van een proef is dit een zeer belangrijk punt. Immers, voor een reeks parallellen zijn de omstandigheden gelijk, doch bij het herhalen van dezelfde proef verschillen de proefomstandigheden, ondanks alle standardisatie, steeds in geringe mate. Het antwoord mag echter niet variëren.

Daarom menen wij dat het noodzakelijk is de testen meermaals te herhalen. Voor ciliaten is de methode van CURDS & VANDYKE (op.cit.) hiervoor een elegante procedure.

De twee proeven met 2,4-D bevestigen de stelling dat het belangrijker is de proef meermaals achtereenvolgens uit te voeren, met een kleiner aantal parallellen, dan een proef slechts éénmaal te verrichten, maar met een zeer groot aantal parallellen. Het is opvallend hoe de resultaten van parallellen binnen eenzelfde proef, dicht bij elkaar liggen, maar hoe

de resultaten van achtereenvolgende gelijke proeven van elkaar verschillen.

Afgezien van het feit dat het resultaat van proeven uitgevoerd in replikatie, beter de werkelijkheid benadert, verhoogt het ook de kans dat de methode van LITCHFIELD & WILCOXON (1948) kan toegepast worden en wel voor de volgende redenen : voor elk van de achtereenvolgende proeven kan men immers het % effect van 0 tot en 100% voor de verschillende concentraties berekenen. In elk van die proeven is het % effect voor de verschillende concentraties echter verschillend. Door eerst het gemiddelde te maken van de resultaten van de verschillende proeven, wordt automatisch het gebied gelegen tussen 0 en 100% effect verbreed, of m.a.w. zijn er meerdere concentraties die een effect hebben dat gelegen is tussen 0 en 100%. Op die manier wordt aan de voorwaarde, opdat de methode van LITCHFIELD & WILCOXON (op.cit.) van toepassing zou zijn, voldaan.

Men moet er wel rekening mee houden dat op deze manier ook de standaarddeviatie van de gegevens, per concentratie, aanzienlijk hoger ligt, dan wanneer een groot aantal simultane parallellen voor eenzelfde concentratie wordt beschouwd. Bij het uitvoeren van een t-test, kan men bijgevolg in sommige gevallen vaststellen dat de effecten van twee opeenvolgende concentraties niet meer significant van elkaar verschillen. Dit is, terloops gezegd, geen bezwaar voor het toepassen van de methode van LITCHFIELD & WILCOXON, waarvan het principe berust op het trekken van de meest waarschijnlijke rechte door een wolk punten die niet noodzakelijk significant moeten verschillen.

Uit het onderzoek met Stylonychia mytilus hebben we volgende punten kunnen afleiden :

- 1) De preliminaire resultaten van de vooropgestelde bioassay-techniek hebben ons toegelaten het relatief belang van het toedienen van voedsel gedurende een toxiciteitstest te onderzoeken. In tegenstelling met hogere organismen zoals crustaceeën en vissen, moeten ciliaten beschikken over een goede voedselbron voor proeven die langer dan 24 uur duren. Het toegediende voedsel bepaalt mede het antwoord van de ciliaat. In dit geval is Stylonychia mytilus 1.5x gevoe-

liger voor 2,4-D indien de ciliaat gevoed wordt met gedroogde gistcellen dan indien deze gevoed wordt met gedroogde wiercellen. In niet-axenische kulturen moet men er tevens rekening mee houden dat omnivore soorten als Stylonychia mytilus zich eveneens voeden met de bacteriën die zich in het milieu ontwikkelen.

- 2) Een gestandaardiseerde bioassay in niet-axenisch midden is slechts te bereiken indien voldoende replikaties (i.f.v. de tijd) in beschouwing worden genomen.

De voorgestelde bioassay voor ciliaten kan gemakkelijk in het routine-onderzoek worden ingeschakeld, ze vergt slechts een kleine inspanning, alleen een lange proefperiode.

5.4. Toxiciteitsonderzoek op Crustacea

5.4.1. Brachiopoda : Onychura (Daphnia magna STRAUS en Daphnia pulex DEGEER)

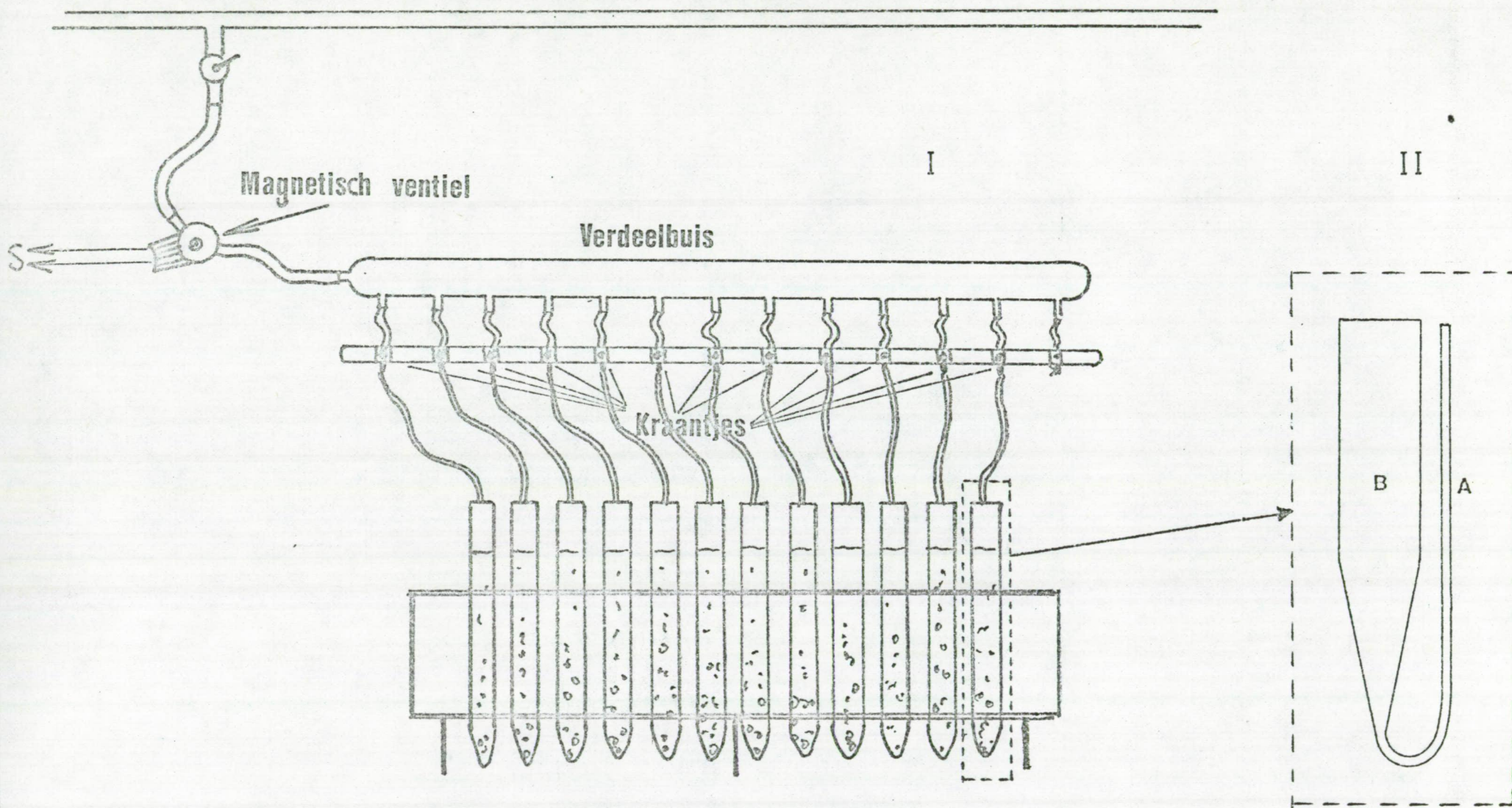
5.4.1.1. Gegevens over de proeforganismen en het onderhouden van de stockkulturen

Watervlooien behoren tot de meest algemeen gebruikte testorganismen voor toxiciteitsstudies op aquatische invertebraten.

Daphnia magna en Daphnia pulex zijn beide zeer geschikte soorten ; ze zijn enerzijds representatief voor het zoetwaterplankton en anderzijds gemakkelijk te kweken in het laboratorium (MUIRHEAD-THOMSON, 1971).

D. magna en D. pulex werden geïsoleerd uit een planktonstaal van een vijver in het natuurreservaat "Het Zwin" (West-Vlaanderen). De stockkulturen werden onderhouden in glazen akwaria bij $\pm 18^{\circ}\text{C}$ en continue belichting met 2 TL-lampen (65 Watt) op een afstand van ± 30 cm. Als kweekmedium gebruikten we zacht zoetwater bereid volgens de formule van CAIRNS. De watervlooien werden dagelijks gevoed met Chlamydomonas reinhardi ; de concentratie van de wiersuspensie in het akwarium werd op ongeveer 10^5 cellen/ml gehouden (SORGELOOS & PERSOONE, 1973).

PERSLUCHTLEIDING



Figuur 38 : I. Rek met kweekbuizen voor crustaceeën.
 II. Kweekbuis in detail (naar SORGeloos & PERSOONE, 1975).

5.4.1.2. Isolatie van larven voor de bioassays

Voor het toxiciteitsonderzoek gebruikten we, in overeenkomst met de methoden van ANDERSON (1944), BRINGMANN & KÜHN (1959), HUBSCHMAN & ENGEL (1965), CROSBY & TUCKER (1966), SANDERS & COPE (1966) en SANDERS (1970), instar I-larven van maximaal 24 uur oud : 10 drachtige wijfjes werden 24 uur vóór het opzetten van de bioassay afgezonderd in cylindrokonische "hatching"- of kweekbuizen (SORGeloos & PERSOONE, 1975) met 150 ml CAIRNS-water (zie Figuur 38). Om de 30 minuten werd het water gedurende een 30-tal sekonden doorborreld met perslucht.

De temperatuur werd konstant gehouden bij 23°C en de buisjes werden vanop 10 cm afstand kontinu belicht met 2 TL-lampen van 65 Watt (1000 à 2000 lux ter hoogte van de buizen). In deze milieuomstandigheden legden de 10 adulte wijfjes een 40-tal larven af.

Alhoewel de pasgeboren Daphnia-larven vrijzwemmend zijn en voedsel kunnen opnemen (PRATT, 1943), werden ze niet gevoed vóór het opstellen van de toxiciteitsproef.

5.4.1.3. Techniek van de bioassays

Er werden twee soorten testen uitgevoerd :

1. Akute test

De proeven met adulten en larven van D. magna en D. pulex werden uitgevoerd volgens het schema van SANDERS & COPE (1966). Bewegingsloze individuen, op het ogenblik van de waarnemingen na 24 en 48 uur, werden als dood beschouwd ; organismen die slechts een kleine aktiviteit van sommige aanhangsels vertoonden, maar zich niet meer konden voortbewegen, werden als immobiel beschouwd (ANDERSON, 1944 ; SANDERS & COPE, op.cit.).

De toxiciteitsproeven werden in duplo uitgevoerd met 10 adulten en met 10 larven in respektievelijk 100 of 50 ml medium van CAIRNS in glazen erlenmeyers. De watertemperatuur bedroeg $23^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en de erlenmeyers werden kontinu belicht vanop ± 30 cm afstand door 2 TL-lampen.

In de meeste proeven werd er geen voedsel toegediend. Daphniden kunnen immers gemakkelijk 3 dagen zonder voedsel overleven (ANTSYSHKINA et al., 1970). De testmedia werden normaliter niet geaereerd.

Voor de toxiciteitsproef met PMU, PZU, diquat en 2,4-D, uitgevoerd met D. magna-larven, werd een tweede serie opgesteld die bij de start gevoederd werd met 2 druppels (± 0.06 ml) gesuspenseerd en gehomogeniseerd Scenedesmus-poeder (SORGeloos, 1973b)(1).

In deze tweede serie werd tevens de invloed van een continue aeratie op de toxiciteit nagegaan.

Voor toxiciteitsproeven uitgevoerd met Daphnia magna werd tevens een vergelijking gemaakt tussen opstellingen zonder luchttoevoer en deze met een konstante luchtdoorborreling (bij middel van een pasteurpipet) a rato van 20 ± 5 ml/min.

De testkoncentraties werden met logaritmische intervallen gekozen. In de brutoproeven waren de extremen van de reeks onderzochte concentraties steeds 0.1-1000 ppm. De keuze van de concentraties van de verfijnde proeven was afhankelijk van het tolerantiegebied : tussen twee opeenvolgende concentraties van de brutoproeven werden drie intermediaire concentraties met logaritmische intervallen uitgetest.

De concentratie/immobilisatie-waarden werden uitgezet op log/probabiliteits-papier. De TL_{50} -waarden werden grafisch bepaald met de "standard graphical interpolation method" van LITCHFIELD (1949).

2. Chronische test

a. Zonder doorborreling

De chronische toxiciteit van 2,4-D werd uitgevoerd op Daphnia magna volgens de statistische test van BIESINGER & CHRISTENSEN (1972). Deze test werd eveneens toegepast door BIESINGER, ANDREW & ARTHUR (1974) en NEBEKER & PUGLISI (1974):

Twintig larven van maximum 24 uur oud werden overgebracht in glazen bekken met 200 ml testmedium. De bekken werden afgedekt met petrischalen om verdamping tegen te gaan.

(1) Kohlenstoffbiologische Forschungsstation e.V. Dortmund, Duitsland.

De temperatuurs- en belichtingsomstandigheden waren dezelfde als voor de akute testen.

De Daphnia's werden dagelijks gevoed met 0.4 ml gesuspendeerd en gehomogeniseerd Scenedesmus-poeder (1.5 g/l aq.dest.). Deze manier van voederen is dus verschillend van de voedselvoorziening zoals voorgeschreven in de methode van BIE-SINGER & CHRISTENSEN, waarbij aan elke beker een "kleine hoeveelheid" voedselsuspensie (stockoplossing : 2 g gedroogd gras + 40 g vismeel per liter water) toegediend werd. Teneinde de kweekcondities zo optimaal mogelijk te houden, verversen we het medium om de 3 dagen (i.p.v. om de week).

Elke dag werd de mortaliteit nagegaan. Na acht dagen waren de Daphnia's volwassen en werden de eerste larven afgelegd. Deze werden elke dag geteld en verwijderd. De proef liep over 3 weken, en werd in quadruplo uitgevoerd.

Bij het einde van de proef bepaalden we, volgens de methode van LITCHFIELD & WILCOXON, de TL_{50} en de ED_{50} t.o.v. het criterium reproductie. Als maat voor de reproductie beschouwden we het aantal larven/dag/wijfje.

b. Met doorborreling

De proef gebeurde in dezelfde omstandigheden als voorgaande experiment maar in "hatching"-buizen, zoals beschreven in 5.4.1.2. (zie figuur 38).

Dagelijks werd 0.2 ml gesuspendeerd Scenedesmus-poeder toegediend. De luchtdoorborreling was diskontinu : om het half uur 30 seconden aeratie.

Het medium werd om de drie dagen verversd.

Gedurende 3 weken werd de mortaliteit en de reproductie van de testorganismen nagegaan, zoals in de testen zonder luchtdoorborreling.

5.4.1.4. Resultaten van de akute bioassays

1ste reeks

Een eerste reeks akute testen met D. magna-larven werd uitgevoerd in 4 verschillende proefomstandigheden : met en zonder voedsel, en met en zonder luchtdoorborreling. Tabel 19 geeft de TL_{50} -waarden weer na 24 en 48 uur.

TL_{50} ppm	+ lucht				- lucht			
	+ voeding		- voeding		+ voeding		- voeding	
	24 u	48 u	24 u	48 u	24 u	48 u	24 u	48 u
2,4-D	220-230	130-140	175-185	130-140	235-245	195-220	230-240	90-120
diquat	1.3-1.3	0.70-0.80	1.3-1.3	0.70-0.75	1.15-1.45	1.2-1.3	1.2-1.4	1.2-1.2
PZU	1.45-1.6	0.70-0.80	1.45-1.95	0.72-0.73	4.0-4.8	1.2-1.6	4.5-5.0	1.6-2.0
PMU	1.95-2.25	0.40-0.45	1.0-1.43	0.44-0.45	2.7-3.85	1.0-1.5	3.1-3.7	1.3-1.4

Tabel 19 : Resultaten van de akute bioassays met D. magna-larven in verschillende testomstandigheden (alle proeven werden in duplo uitgevoerd).

2de reeks

In een tweede reeks akute testen werden naast de herbiciden ook de uitvloeiers lissapol NX en ethomeen S25 onderzocht. Er werd een vergelijking gemaakt tussen het effect van deze produkten op adulten en larven van Daphnia magna en Daphnia pulex. Tabel 20 geeft de TL_{50}^{24} - en TL_{50}^{48} -waarden weer.

TL ₅₀	in ppm	<u>Daphnia magna</u>		<u>Daphnia pulex</u>	
		<u>adulten</u>	<u>larven</u>	<u>adulten</u>	<u>larven</u>
Paraquat zonder uitvloeier					
24 uur	1	6.6	6.6	7.3	4.2
	2	7.6	5.6	7.5	3.8
48 uur	1	3.5	2.7	2.4	1.35
	2	3.9	2.9	2.4	1.25
Paraquat met uitvloeier					
24 uur	1	7.6	2.7	7	4.2
	2	7.6	2.9	7	4.2
48 uur	1	3.2	1.8	2.9	1
	2	3.2	1.8	2.6	1.1
Lissapol NX					
24 uur	1	56	14	12	6.2
	2	42	14.5	11	7
48 uur	1	18	12	8	4.6
	2	16	12.5	9	5.1
DS "4392"					
24 uur	1	15	5.6	5.1	4.3
	2	16	5.1	5.6	4.1
48 uur	1	11.9	4.3	4.4	3.6
	2	11	4.4	4	3.9
Diquat					
24 uur	1	6.8	2.45	1.35	1.55
	2	7	2.5	1.35	1.51
48 uur	1	3.2	0.66	0.43	0.32
	2	2.8	0.56	0.40	0.35
2,4-D					
24 uur	1	228	210	36	10
	2	207	196	40	9.6
48 uur	1	153	112	24	7.4
	2	162	98	28	5.8

Tabel 20 : TL₅₀-waarden met D. magna en D. pulex adulten en larven na 24 en 48 uur.

5.4.1.5. Bespreking van de resultaten

1ste reeks

Op een paar uitzonderingen na kunnen de 4 herbiciden als volgt gerangschikt worden volgens dalende toxiciteit voor de larven van de watervlo D. magna :

diquat > PMU > PZU >> 2,4-D

Niettegenstaande de TL₅₀-waarden variëren i.f.v. de proefomstandigheden, blijft de volgorde dezelfde.

a) De invloed van het toedienen van voedsel op de toxiciteit van de herbiciden voor Daphnia magna-larven :

- Op enkele uitzonderingen na verschillen de TL₅₀-waarden niet voor de reeksen met gevoede Daphnia's t.o.v. niet gevoede dieren.

Dit bewijst dat :

1. de algemene regel als zijn gevoede organismen resistent voor toxikanten dan niet gevoede (SPRAGUE, 1969) niet zo algemeen is ;
 2. het effect van diquat, PZU en PMU voor Daphnia magna niet verhoogd wordt door een opname langs de voedselketen, hetgeen erop zou wijzen dat de adsorptie van het toxikans op de voedselpartikels de toxiciteit via intestinaal contact niet opvallend vergroot. Volgens CROSBY & TUCKER (op.cit.) zou het respiratorisch contact veel belangrijker zijn dan het oraal contact.
- In de uitzonderingsgevallen wordt de toxiciteit inderdaad verlaagd door het toevoegen van voedsel. Dit verschil is echter steeds relatief klein. Met uitzondering nochtans voor 2,4-D na 48 u zonder luchtdoorborreling : 208 ppm met voedsel t.o.v. 105 ppm zonder voedsel.

b) De invloed van de luchtdoorborreling op de toxiciteit van de herbiciden voor Daphnia magna-larven :

Door Daphnia magna-larven zijn de herbiciden PMU en PZU gemiddeld 2.5x toxischer in doorluchte media dan zonder aeratie. De toxiciteit van diquat is in beide omstandigheden kwasi identiek.

Voor 2,4-D echter is in het geval van aeratie van het medium het verschil in toxiciteit tussen de gevoede en de niet ge-

voede serie alleen merkbaar na 24 u. Wordt het medium niet met lucht doorborreld dan stijgt de gevoeligheid zeer sterk in de niet gevoede serie.

Na 48 u is de combinatie - lucht + voedsel de minst toxische van de vier series en de combinatie - lucht - voedsel de meest toxische. Deze laatste testopstelling is daarenboven de enige waarbij de toxiciteit van een produkt groter is in niet geaereerde omstandigheden dan in geaereerde.

Uit de resultaten van de eerste reeks akute testen blijkt dat :

- 1) De stelling dat de konstante luchtdoorborreling een zeer negatief effect zou hebben op D. magna-larven wordt tegengesproken door de cijfers voor 2,4-D en diquat.
- 2) De verhoogde toxiciteit van paraquat zowel met als zonder uitvloeiers in een geereerd milieu volledig strookt met het werkingsmechanisme van paraquat gevonden in planten en hogere dieren (zie 4.1.2. en 4.1.5.) : het autoöxiderend paraquat zet O_2 om in het superoxide radikaal $O_2^{\cdot-}$, dat een peroxidatie van de lipiden als gevolg heeft.
- 3) Analooq werd voor diquat vastgesteld dat de toxiciteit na 48 u gaat stijgen wanneer het medium geaereerd wordt. Opgeloste zuurstof verhoogt de toxiciteit van diquat. Dit stemt volledig overeen met het werkingsmechanisme van diquat analooq aan dat van paraquat.
- 4) In tegenstelling met de verschijnselen waargenomen voor de dipyridyliums interfereert de aeratie niet met het werkingsmechanisme van 2,4-D. Daarentegen bestaat er een interactie tussen de luchtdoorborreling, de voedselvoorziening van de testorganismen en de testduur voor wat betreft de toxiciteit van 2,4-D : gemiddeld zijn gevoede organismen resistenter dan niet gevoede en de toxiciteit ligt iets hoger in de testen met luchtdoorborreling dan zonder. Een uitzondering hierop is de -lucht - voedsel combinatie, waarbij de D. magna-larven na 48 u zeer gevoelig zijn voor 2,4-D. Het is echter onmogelijk om aan de hand van deze resultaten het interaktiemechanisme van de drie variabelen te achterhalen.

2de reeks

Uit de bekomen resultaten blijkt dat :

- 1) De TL_{50} -waarden verschillen naargelang de Daphnia-soort, het ontwikkelingsstadium en het uitgeteste produkt.

Enerzijds zijn de larven steeds gevoeliger dan de adulten en anderzijds is Daphnia pulex (adulten + larven) gevoeliger dan Daphnia magna : voor 2,4-D is dit zeer in het oog springen : de pulex-larven zijn 15 à 20 maal gevoeliger dan de magna-larven, de adulten 5 à 10 maal. Het verschil in de gevoeligheid van beide soorten is ook belangrijk voor de uitvloeiers en voor diquat. Voor paraquat is het verschil gering.

Onze resultaten in verband met de hogere gevoeligheid van D. pulex t.o.v. D. magna bevestigen de bevindingen van SANDERS & COPE (1966) voor herbiciden en deze van KOCHER et al. (1973) voor insekticiden.

SANDERS & COPE (op.cit.), die de gevoeligheid van instar I (18 u oud), instar II (48 u) en latere instar-larven (7 dagen) van Simocephalus serrulatus vergeleken, kwamen tot de vaststelling dat er geen significant verschil bestaat tussen de gevoeligheid van de eerste twee stadia. De 7 dagen oude cladoceren daarentegen waren 1.7 tot 3.8 keer minder gevoelig dan de instar I larven ($p < 0.0.5$).

Ook ANDERSON (1950) kwam vroeger reeds tot het besluit dat bij Daphnia magna de larven gevoeliger zijn dan de adulten.

- 2) De volgorde qua toxiciteit is voor Daphnia magna en pulex dezelfde en gelijk aan deze vermeld voor de eerste reeks akute proeven (zie pag. 93).

Aangevuld met de gegevens voor lissapol NX en ethomeen S25 wordt deze volgorde, gerangschikt van hoge naar lagere toxiciteit :

diquat > PMU > PZU > ethomeen S25 > lissapol NX >> 2,4-D

Diquat is voor beide cladoceren het meest toxische herbicide. Het al of niet aanwezig zijn van uitvloeiers heeft weinig invloed op de toxiciteit van paraquat. De verklaring hiervoor is zeer duidelijk bij Daphnia magna, en iets minder duidelijk bij Daphnia pulex. Immers, enerzijds zijn de beide uitvloeiers minder toxisch dan de her-

biciden zelf en anderzijds blijkt er voor de Daphnia-soorten geen synergisme of antagonisme te bestaan tussen het paraquat en de detergenten.

Voor de 42 organische en anorganische produkten die door ANDERSON (1944) werden uitgetest op 8 u oude Daphnia magna-larven in een akute test van 16 u, zijn er slechts 5 die toxischer zijn dan paraquat, diquat en de uitvloeiers die door ons werden uitgetest. Dit zijn CrO_3 , CuSO_4 , CuCl_2 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, KMnO_4 . T.o.v. deze reeks produkten is 2,4-D middelmatig toxisch.

In Tabel 21 worden onze waarnemingen vergeleken met enkele TL_{50} -waarden uit de literatuur. Deze gegevens zijn niet absoluut met elkaar te vergelijken aangezien de diverse auteurs in onderling verschillende proefomstandigheden gewerkt hebben. De enige standaardisatie van de proeven weergegeven in deze tabel is het ontwikkelingsstadium van het testorganisme en de duur van de proef. Alle proeven zijn statische testen. Uit deze tabel blijkt niettemin dat de grootte-orde vrij goed overeenkomen.

Produkt	Auteur	TL ₅₀ -waarden in ppm	onze waarnemingen	
			TL ₅₀ ²⁴	TL ₅₀ ⁴⁸
<u>Daphnia magna</u> -larven				
Paraquat	CROSBY & TUCKER (1966)	TL ₅₀ ²⁶ 11.0 (9.1-12.2)	6.1	2.8
Diquat	CROSBY & TUCKER (1966)	TL ₅₀ ²⁶ 7.1 (6.3-8.0)	2.5	0.61
<u>Daphnia pulex</u> -larven				
Paraquat	SANDERS & COPE (1966)	TL ₅₀ ⁴⁸ 3.7 (2.8-4.8)	4.0	1.30
<u>Daphnia pulex</u> -adulten				
Paraquat	CARTER & WILLIAMS (1968)	TL ₅₀ ²⁴ 18	7.4	2.4
		TL ₅₀ ⁴⁸ 4		
2,4-D	PRAVDA (1973)	TL ₅₀ ⁴⁸ 10	38	26

Tabel 21 : Vergelijking tussen de resultaten van de akute testen met Daphnia en literatuurgegevens.

Tabel 22: Chronische test met 2,4-D op Daphnia magna : zonder luchtdoorborreling:

A+ : kumulatief aantal dode adulten (maximum 20)

L : aantal larven per waarneming (de larven worden telkens verwijderd)

dagen		7	8	9	10	13	14	15	16	17	20	21
blanko	A+	0	0	0	0	0	0	2	2	3	3	3
	L	0	0	0	1	65	98	72	13	210	160	20
	A+	0	0	0	0	3	3	3	5	6	6	6
	L	0	0	0	0	53	47	59	14	43	165	0
	A+	0	0	0	4	7	7	7	7	7	8	8
	L	0	0	0	0	29	25	76	31	72	44	17
	A+	0	0	0	0	3	3	4	5	5	5	5
	L	0	0	0	1	17	133	45	60	84	117	20
10 ppm	A+	0	0	0	1	1	1	1	1	1	3	5
	L	0	0	0	3	34	5	12	3	15	18	0
	A+	0	0	0	0	0	13	13	13	13	13	13
	L	0	7	0	0	0	33	14	10	0	11	9
	A+	0	0	0	0	0	1	1	2	2	8	8
	L	0	1	0	0	0	2	0	3	0	4	3
	A+	0	0	0	0	2	5	7	10	11	11	11
	L	4	9	0	14	2	0	0	0	0	10	37
1 ppm	A+	0	0	0	0	0	0	2	4	4	4	5
	L	0	3	0	0	0	0	7	55	12	12	155
	A+	0	0	0	0	6	6	6	6	6	6	6
	L	0	0	0	0	23	2	77	14	24	188	22
	A+	0	0	0	0	5	5	6	8	9	9	9
	L	11	0	0	0	10	7	11	10	14	95	32
	A+	0	0	0	0	0	0	0	3	3	3	4
	L	24	0	0	12	51	8	31	0	26	174	15
0.1 ppm	A+	0	0	0	0	0	6	6	6	6	7	7
	L	0	0	0	1	59	19	49	10	33	228	41
	A+	0	0	0	0	3	3	3	4	6	6	6
	L	0	0	0	9	42	13	30	4	93	100	0
	A+	0	0	0	0	2	2	2	2	3	4	4
	L	0	0	0	16	54	13	70	0	38	102	29
	A+	0	0	0	0	2	2	2	2	3	4	5
	L	21	0	0	24	63	43	100	19	59	259	6

dagen		10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
blanko	A+	2	2	2	2	3	3	4	4	4	4	4	4
	L	50	102	32	23	39	172	47	101	55	6	0	0
	A+	1	1	1	2	2	2	2	2	2	3	3	3
	L	80	119	49	49	100	54	183	24	42	0	0	16
	A+	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	3
	L	53	88	19	33	46	166	17	156	46	22	25	13
100 ppm	A+	0	1	1	2	2	2	14	14	14	14	14	14
	L	0	24	45	3	54	8	2	0	16	0	0	0
	A+	3	3	3	3	3	3	8	8	9	10	11	12
	L	8	43	24	0	33	4	0	0	27	0	0	0
	A+	1	1	1	1	1	1	1	10	10	10	10	10
	L	7	35	15	16	14	1	1	0	10	0	0	0
56 ppm	A+	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	4	4
	L	41	88	24	46	40	11	3	2	60	7	25	37
	A+	0	0	0	0	3	4	4	4	8	9	9	9
	L	45	104	18	51	82	4	8	0	10	0	0	17
	A+	0	0	0	0	0	0	1	1	3	3	6	6
	L	28	69	6	60	56	16	7	2	98	38	0	42
32 ppm	A+	0	0	0	1	3	3	9	12	12	12	12	12
	L	169	98	11	108	137	24	17	3	20	0	0	0
	A+	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4
	L	63	158	1	135	135	19	8	11	83	53	28	14
	A+	3	3	3	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	L	84	161	2	120	107	21	7	4	113	0	32	30

Tabel 23 : Chronische test met Daphnia magna : met luchtdoorborreling:

A+ : kumulatief aantal dode adulten (maximum 20)

L : aantal larven per waarneming (de larven werden telkens verwijderd.)

dagen		1	2	3	4	5	8	9	10	11	12
blanko	A+	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2
	L	0	0	0	0	18	106	131	45	66	36
	A+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	L	0	0	0	0	16	84	90	56	47	38
	A+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	L	0	0	0	0	2	116	151	54	133	39
0.1 ppm	A+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	L	0	0	0	0	20	97	75	84	18	133
	A+	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2
	L	0	0	0	0	26	81	50	29	129	33
	A+	0	0	0	0	1	2	2	2	2	2
	L	0	0	0	0	12	145	29	39	135	118
1 ppm	A+	0	0	0	0	1	2	3	4	6	6
	L	0	0	0	12	24	111	135	9	25	13
	A+	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
	L	0	0	0	6	31	133	111	65	131	25
	A+	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2
	L	0	0	0	5	2	78	92	52	111	118
10 ppm	A+	0	0	0	0	1	1	3	3	3	3
	L	0	0	0	0	5	142	20	43	140	13
	A+	0	0	0	0	1	1	2	3	3	3
	L	0	0	0	0	32	173	96	42	102	27
	A+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	L	0	0	0	21	6	183	161	76	37	23

Tabel 24 : Chronische test met 2,4-D op Daphnia magna : met luchtdoorborreling :
A+ : kumulatief aantal dode adulten (maximum 20).
L : aantal larven per waarneming (de larven worden telkens verwijderd derd.)

Uit de twee reeksen akute testen kan men het volgende konkluderen :

- 1) Daphnia magna en pulex zijn beide geschikte testorganismen voor toxiciteitsonderzoek. D. pulex is beduidend gevoeliger dan D. magna. Voor beide soorten zijn de larvale stadia veel gevoeliger voor toxikanten dan de adulten.
- 2) In statische bioassays met Daphnia-soorten spelen de proefomstandigheden een belangrijke rol bij het bepalen van de toxiciteit van een of ander produkt. Het toedienen van voedsel aan de testorganismen beïnvloedt de toxiciteit van de uitgeteste produkten omzeggens niet. Er treedt dus in deze korte tijdspanne blijkbaar geen verhoogde intoxicatie via de ingestie van voedsel op.

Voor de aeratie van het medium gebruikt men best geen konstante luchtdoorborreling : voor het op peil houden van de opgeloste zuurstof in de oplossingen is een diskontinue aeratie voldoende en tevens wordt de eventuele fysische hinder veroorzaakt door de doorborreling op de Daphnia-larven tot een minimum beperkt.

- 3) Uit onze proeven, die trouwens de bestaande literatuurgegevens bevestigen blijkt dat :
 1. de dipyridylumherbiciden zeer toxisch zijn voor beide cladoceren ;
 2. de twee uitvloeiers iets minder schadelijk zijn ;
 3. het herbicide 2,4-D op korte termijn slechts een geringe toxiciteit vertoont.
- 4) De parallelle proeven met en zonder luchtdoorborreling wijzen op een analoog werkingsmechanisme van paraquat en diquat bij Daphnia, als dat beschreven voor planten en zoogdieren (zie 4.1.2. en 4.1.5.).
- 5) Er doen zich geen opvallende interacties voor tussen paraquat en beide uitvloeiers voor wat betreft toxische effecten op de cladoceren.

5.4.1.6. Resultaten van de chronische testen met D. magna

Het kumulatief aantal dode adulten en het aantal larven per waarneming is weergegeven in (Tabel 22 tot 24). De TL₅₀-waarden na 3 weken, voor de larven opgekweekt tot het

Zonder doorborreling

Aantal larven per wijfje afgelegd ge- durende de gehele proef		Periode (dagen)	Aantal larven/ wijfje/dag		% inhibitie t.o.v. blanco
Blanco	35.86	12	2.99	2.75	0
	25.14	9	2.79		
	23.01	9	2.56		
	31.75	12	2.65		
10 ppm	4.85	12	0.40	0.60	78,2%
	11.00	8	1.38		
	0.86	8	0.11		
	6.03	12	0.50		
1 ppm	15.66	7	2.24	2.04	25.8%
	25.00	9	2.78		
	14.90	9	1.66		
	17.80	12	1.48		
0.1 ppm	31.62	12	2.64	2.16	21.5%
	19.49	12	1.62		
	18.83	12	1.57		
	33.58	12	2.80		

Met doorborreling

Blanco	25.00	8	3.13	3.02	0
	29.12	8	3.64		
	18.38	8	2.30		
10	24.62	8	3.08	3.17	-5%
	27.72	8	3.47		
	26.68	9	2.96		
1	19.25	9	2.14	2.87	+5%
	27.78	9	3.09		
	30.48	9	3.39		
0.1	25.12	8	3.14	3.19	-5.6%
	21.57	8	2.70		
	29.83	8	3.73		
Blanco	36.97	12	3.08	3.13	0%
	39.10	12	3.26		
	36.66	12	3.06		
100	10.24	11	0.93	0.72	77%
	9.04	12	0.75		
	5.73	12	0.47		
56	20.57	12	1.71	1.74	44.4%
	18.85	12	1.57		
	23.22	12	1.94		
32	33.48	12	2.79	3.33	-6.4%
	43.46	12	3.62		
	42.94	12	3.58		

Tabel 25 : Chronische test met 2,4-D op Daphnia magna : Inhibitie van de reproductie.

adult stadium in media zonder luchtdoorborreling en in media met luchtdoorborreling zijn :

TL ₅₀	3 weken	met doorborreling	zonder doorborreling
		96 ppm (226-41 ppm)	21 ppm

(Voor de proef zonder doorborreling kon de methode van LITCHFIELD & WILCOXON (1948) voor het berekenen van de betrouwbaarheidsgrenzen niet worden gebruikt wegens gebrek aan intermediaire resultaten tussen 0 en 100% mortaliteit).

Om het effect van 2,4-D op de reproductie van Daphnia magna na te gaan werd het aantal larven berekend geproduceerd per wijfje gedurende de gehele duur van de proef. Dit aantal gedeeld door de periode uitgedrukt in dagen waarin deze larven werden afgelegd geeft het aantal larven weer afgelegd per wijfje en per dag (Tabel 25).

De vermindering in aantal larven afgelegd, per wijfje en per dag in de testoplossing t.o.v. de resultaten in de blanco, wordt uitgedrukt in procent, en wordt percent-effekt genoemd.

Aan de hand van deze percenten kan men de ED₅₀-waarde met de reproductie als criterium berekenen :

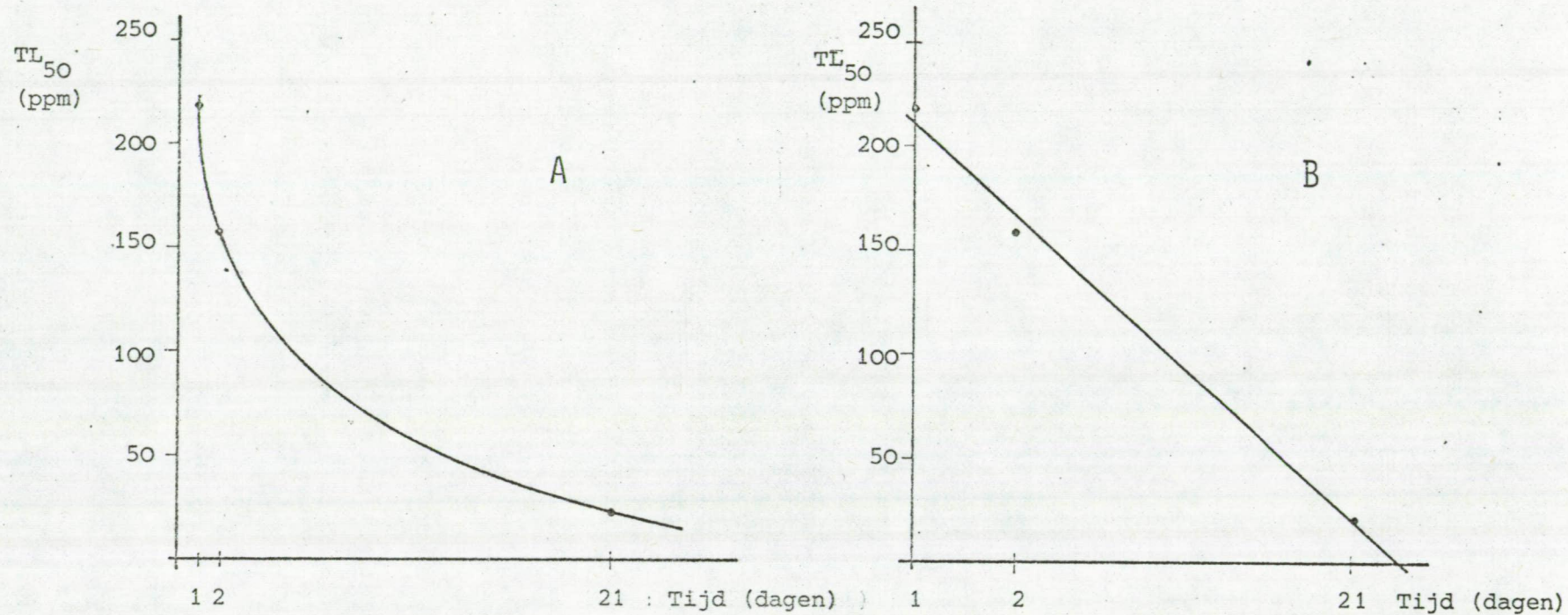
ED ₅₀	3 weken	met doorborreling	zonder doorborreling
		58 (40-83)ppm	1.25 ppm

(Om dezelfde reden als hierboven konden de betrouwbaarheidsgrenzen van de ED₅₀ voor de proef zonder doorborreling niet berekend worden).

5.4.1.7. Bespreking van de resultaten

Uit deze resultaten kan men afleiden dat :

- (1) het criterium inhibitie van de reproductie bij Daphnia magna veel gevoeliger is dan het criterium mortaliteit (beide over een termijn van 3 weken). Dit is het duidelijkst voor de proeven zonder luchtdoorborreling, waarvoor de ED₅₀-waarde voor de reproductie van 1.25 ppm bijzonder laag is in vergelijking met alle andere ED₅₀- en TL₅₀-waarden.
- (2) de diskontinue aeratie van het medium de toxiciteit van de 2,4-D verlaagt. De TL₅₀-waarde daalt men een faktor



Figuur 39 : 'Dosis-Effekt'-kurve voor de toxiciteitsproeven met 2,4-D op Daphnia magna-adulten.
 A. Tijd lineair uitgezet.
 B. Tijd logaritmisch uitgezet.

1.7, de ED_{50} -waarde voor de reproductie met een faktor 17. Deze vaststelling is enigszins tegenstrijdig met de resultaten van de akute testen met D. magna-larven waarvoor de toxiciteit van 2,4-D meestal iets werd verhoogd door een konstante doorborreling.

Beide reeksen proeven zijn echter te verschillend wat betreft proefopstelling en testduur om een absoluut vergelijk mogelijk te maken.

Gezien de beperkte experimentele gegevens is de interactie die optreedt tussen de factoren testduur, aeratie van het medium, voedselvoorziening van de testorganismen op de toxiciteit van 2,4-D voor D. magna-larven niet te ontleden.

Indien we de TL_{50} -waarden van de chronische test zonder luchtdoorborreling vergelijken met de TL_{50} -waarden van de akute testen, dan stellen we vast dat deze waarden dalen i.f.v. de tijd. Door de TL_{50} -waarden uit te zetten i.f.v. de tijd, bekomen we een zgn. "dosis-effekt-kurve".

Figuur 39A stelt een tentatieve dosis-effekt-kurve voor (met slechts drie punten), voor de toxiciteitsproeven met 2,4-D op D. magna (mortaliteit als criterium). De exponentiële funktie van deze kurve kan in een rechtlijnig verband worden omgezet door de tijdas logaritmisch te transformeren (Figuur 39B).

Alhoewel uit de akute toxiciteitstesten blijkt dat het herbicide 2,4-D een vrij onschadelijk produkt is voor Daphnia magna, volgt nochtans uit de dosis-effekt-kurve dat 2,4-D een vrij belangrijke chronische toxiciteit vertoont voor deze soort.

Heel belangrijk is het chronisch subleetaal effect van 2,4-D op de reproductie van D. magna.

De ED_{50} ^{3 weken} voor de proevenreeks zonder luchtdoorborreling en met als criterium de reproductieremming, bedraagt slechts 1.25 ppm. Indien we deze waarde vergelijken met de resultaten van BIESINGER & CHRISTENSEN (op.cit.) voor metaalionen en van BIESINGER et al. (op.cit.) voor nitrilotriacetat (NTA) en NTA-metaalkomplexen, dan blijkt dat 2,4-D toxischer is dan Na, Ca, Mg, K, Sr, Ba, Fe, Mn, As, Sn-ionen en 2

tot 10 maal minder toxisch dan Cr, Al, Zn, Au, Ni en Pb-ionen. Cu-ionen zijn ongeveer 35 maal toxischer dan 2,4-D. Uit het onderzoek van NEBEKER & PUGLISI (op.cit.) blijkt dat PCB's in het algemeen 10 à 20 maal toxischer zijn dan 2,4-D.

Het chronisch effect van diquat werd onderzocht door GILDERHUS (1967) aan de hand van een ander type statische chronische test. De resultaten van deze auteurs met het herbicide diquat zijn te vergelijken met onze resultaten met 2,4-D : 1-3 ppm diquat veroorzaakt een hoge mortaliteit van de adulten en een belangrijke remming van de reproductie van de overlevende wijfjes.

Samenvattend kan men stellen dat het chronisch effect van 2,4-D op Daphnia magna zeer groot is in vergelijking met het acuut effect. Hieruit volgt dat 2,4-D als aquatisch herbicide, op lange termijn wellicht een even drastisch effect heeft op deze cladoceren als het diquat, dat acuut het meest toxisch is.

5.4.2. Branchiopoda : Anostraca (Artemia salina)

5.4.2.1. Inleiding

De Cladocera, meestal vertegenwoordigd door Daphnia magna en Daphnia pulex, worden reeds veel langer gebruikt als testorganisme dan om het even welke andere mikrocrustacee.

Ofschoon de informatie over de dosis-effekt-relatie van toxikanten met deze beide Cladocera-soorten zeer waardevol is, kan ze echter niet als representatief bestempeld worden voor de mikrocrustacea in het algemeen.

"One of the most striking features to emerge from work in recent years on other groups of mikrocrustacea, is the very wide difference in reaction which may be shown by different groups to one and the same insecticide. These differences have emerged from both field observations and laboratory studies" (MUIRHEAD-THOMSON, 1971).

Teneinde een idee te krijgen van het verschil in gevoeligheid voor herbiciden t.o.v. Daphnia hebben we een reeks akute toxiciteitsproeven uitgevoerd met een mariene

vertegenwoordiger van de mikrocrustaceeën : het pekelkreeftje Artemia salina. Deze soort, die een wereldverspreiding kent in zgn. "zoutmeren" en estuaria met hoge saliniteit, is, door zijn beschikbaarheid onder de vorm van gedroogde cysten een buitengewoon interessant testorganisme.

5.4.2.2. Hatching en separatie van de larven

Cysten afkomstig van San Francisco Bay (California) (1) werden gedurende 24 uur geïnkubeerd bij 23°C in artificieel zeewater, bereid volgens de formule van DIETRICH & KALLE (1963)(sal. 35‰). De cystensuspensie werd kontinu geaereerd en belicht met 2 TL-lampen (SORGeloos & PERSOONE, 1975).

SORGeloos (1975) stelde vast dat in analoge omstandigheden doch bij een temperatuur van 24°C, na een immersieperiode van 23 u een hatchingsrendement van 50% bereikt wordt. Het ontluikingsproces is zeer sterk temperatuur gevoelig. De hatchingssnelheid is recht evenredig met de temperatuur. Na 24 u immersie bij 23°C kan men aldus larven oogsten die hooguit enkele uren oud zijn.

De separatie van de larven van de lege eischalen en de nog niet ontloken eieren gebeurde aan de hand van een separator-box, beschreven door PERSOONE & SORGeloos (1972).

5.4.2.3. Bioassay-techniek

Met uitzondering van het gebruik van artificieel zeewater i.p.v. zoetwater, werden deze toxiciteitstesten uitgevoerd in dezelfde omstandigheden als de akute testen met Daphnia magna. De keuze van de testkoncentraties gebeurde eveneens op dezelfde manier als beschreven bij de Daphnia-soorten. Ze gebeurden in parallel met en zonder voedsel en met en zonder continue luchtdoorborreling. Als voedsel werd bij de start 2 druppels (+ 0.06 ml) gehomogeniseerde Scenedesmus-suspensie (1.5 g gedroogde wieren/1 zeewater)(SORGeloos, 1975) toegediend.

(1) 1250 gram vakuum verpakt - San Francisco Bay Brand Inc., Newark, California, U.S.A.

Als mortaliteitskriterium na 24 u en 48 u testduur, gebruikten we net als voor de proeven met Daphnia de onbeweeglijkheid der organismen.

5.4.2.4. Resultaten

De TL_{50}^{24} en TL_{50}^{48} -waarden worden weergegeven in Tabel 26 :

	+ lucht				- lucht			
	+ voeding		- voeding		+ voeding		- voeding	
	24 u	48 u	24 u	48 u	24 u	48 u	24 u	48 u
2,4-D	230-250	130-140	235-245	120-140	500-520	360-380	545-575	300-340
diquat	50-50	12-13	48-52	12-15	100-120	24-26	105-115	22-26
PZU	135-145	62-66	135-150	66-70	212-225	61-66	212-225	70-73
PMU	44-48	40-44	44-45	40-44	155-165	60-62	200-240	70-75

5.4.2.5. Bespreking van de resultaten

- a) Invloed van het toedienen van voedsel op de toxiciteit van de herbiciden voor Artemia salina-larven :
- Het al dan niet voederen der larven blijkt geen enkele invloed te hebben op de toxiciteit van 2,4-D, diquat, PMU en PZU. Dit is eigenlijk te verwachten voor de observatiereeks na 24 u gezien de larven in het instar I-stadium nog geen voedsel opnemen. Na 48 u echter zijn alle larven verveld naar het instar II- en sommige naar het instar III-stadium dat zich wel actief voedt (SORGeloos, op.cit.). In onze proeven echter heeft ook na 48 u het toedienen van voedsel geen invloed op de TL_{50} -waarden. Hieruit kan men besluiten dat het effect van deze toxikanten via een verhoogd intestinaal contact door de aanwezigheid van voedselpartikels, niet wordt vermeerderd.

- b) Invloed van de luchtdoorborreling op de toxiciteit van de herbiciden voor Artemia salina-larven :
- Het is zeer belangrijk op te merken dat de mortaliteit der larven in de reeksen met continue luchtdoorborreling twee-

maal hoger is dan in deze zonder doorborreling. Kontinue doorborreling van het medium blijkt dus, in tegenstelling met de resultaten bekomen voor Daphnia magna, zeer nefast te zijn voor de Artemia-larven. Vandaar dat we meer belang zullen hechten aan de resultaten zonder aeratie.

Niettemin valt er op te merken dat de volgorde in toxiciteit (van hoogste naar laagste) verschilt naargelang al dan niet geaereerd werd :

+ luchtdoorborreling

na 24 uur : PMU \geq diquat > PZU > 2,4-D

na 48 uur : diquat > PMU > PZU > 2,4-D

- luchtdoorborreling

na 24 uur en

na 48 uur : diquat > PMU = PZU > 2,4-D

De toxiciteit van PMU en diquat wordt in vergelijking met de andere herbiciden sterk verhoogd door aereren van het medium.

Na 24 uur is de toxiciteit van deze beide herbiciden in geaereerde omstandigheden kwasi dezelfde, maar na 48 uur merken we nog een supplementaire verhoging van de toxiciteit van diquat (zie Tabel 26).

Niettegenstaande de minder optimale proefomstandigheden vinden we hier opnieuw een aanduiding voor een analoge toxische werking van paraquat en diquat bij Artemia als beschreven voor planten en hogere dieren (cfr. eveneens resultaten bekomen met D. magna).

Het synergistisch effect van de uitvloeiers met het paraquat is sterk uitgesproken voor de Artemia-larven in geaereerde omstandigheden. Dit kan in de eerste plaats te wijten zijn aan de ab- en adsorptiekinetiek van paraquat die door de tensioaktieven wordt beïnvloed (zie 6.2.). Doch in de tweede plaats kunnen de uitvloeiers het gehalte aan beschikbare opgeloste zuurstof in het medium bepalen en aldus de toxische werking van paraquat beïnvloeden. Immers, aeratie van het medium verhoogt veel sterker de toxiciteit van PMU dan van PZU zowel voor Daphnia magna als voor Artemia salina.

SORGeloos (1975) en VAN DER WIELEN & SORGeloos (1976) stelden vast dat er een groot verschil in gevoeligheid bestaat voor chroomzuur tussen de verschillende larvale stadia van Artemia salina.

De TL_{50}^I -waarden voor de verschillende stadia zijn :

Instar I : 30 ppm
 Instar II : 7.4 ppm
 Instar III : 8.2 ppm

Ook WISELEY & BLICK (1967), vinden een belangrijke daling in de TL_{50} -waarden voor Cu-ionen \pm 18 uur na het uitkomen van de larven. In de omstandigheden waarbij zij werkten stemt deze daling overeen met de overgang van het eerste naar het tweede instar-stadium (SORGeloos, 1975).

Evenzo vonden wij in onze experimenten een belangrijk verschil tussen de TL_{50}^{24} en TL_{50}^{48} -waarden. Tabel 27 geeft de verhoudingen TL_{50}^{24} 24 uur/48 uur voor de verschillende proeven weer.

Alhoewel de stadia niet werden gecontroleerd kan men aan de hand van de gegevens van SORGeloos (1975) stellen dat, in de gegeven omstandigheden bij de waarneming na 24 uur in overmaat instar I-larven aanwezig waren en na 48 uur hoofdzakelijk instar II.

verhouding $\frac{TL_{50}^{48}}{TL_{50}^{24}}$	+ lucht		- lucht	
	+ voeding	- voeding	+ voeding	- voeding
2,4-D	1.8	1.8	1.4	1.8
diquat	3.7	3.7	4.3	4.6
PZU	2.2	2.1	3.4	3.1
PMU	1.1	1.1	2.6	3.0

Tabel 27 : Verhoudingen van de TL_{50} -waarden na 24 uur en 48 uur met Artemia salina-larven.

De verhouding van de TL_{50}^{24} 24 uur/48 uur ligt voor de proeven zonder aeratie steeds hoger dan voor de proeven

met doorluchting. M.a.w. het verschil in gevoeligheid van instar I en instar II-III-larven is frappanter in geaereerde omstandigheden dan in niet geaereerde. Dit kan verband houden met de schadelijke invloed van de doorborreling op de larven, waarbij instar I-larven gevoeliger zouden zijn voor de aeratie dan instar II-larven/

Deze verhouding schijnt typerend te zijn voor het uitgeteste toxikans, onafhankelijk van de voedseltoediening en in zekere mate ook van de aeratie. Vnl. diquat heeft een hoge TL_{50} 24/48-verhouding, wat betekent dat de toxiciteit sterk verandert in functie van de tijd, dus wellicht in functie van het ontwikkelingsstadium van de Artemia-larven.

SORGELOOS (op.cit.) verklaart het belangrijke verschil in gevoeligheid tussen instar I en II-III-nauplii, "door het feit dat in het eerste larvaal stadium het spijsverteringskanaal nog niet rechtstreeks in verbinding staat met de buitenwereld. Toxische stoffen hebben in het instar I-stadium alleen een werking op het ectoderm (dat bedekt is met een dunne kutikula). Vanaf het tweede stadium komen opgeloste stoffen en kleine partikels, via de mond in het darmkanaal terecht waar ze het wellicht veel gevoeliger endodermmaal weefsel aantasten".

PROVASOLI & SHIRAISHI (1959) menen dat het midden-darmkanaal van arthropoden de voornaamste absorberende plaats is. Niettemin beweren CROSBY & TUCKER (op.cit.), dat voor Crustacea (i.c. Cladocera) het respiratorisch contact met de herbicide 2,4-D, paraquat en diquat, veel belangrijker is dan het oraal contact.

In elk geval worden de herbiciden niet via de voedselpartikels langs het darmkanaal door het organisme geabsorbeerd vermits het toedienen van voedsel zowel voor Daphnia magna als voor Artemia salina in geen geval de toxiciteit verhoogt.

5.4.3. Decapoda : Brachyura (Rhithropanopens harrisii) GOULD

5.4.3.1. Inleiding

Ten einde ook informatie te verkrijgen over de invloed van toxikanten op de, op bepaalde ogenblikken van het

jaar zeer belangrijke meroplanktonische makrocrustaceënfau-
na van de estuaria, werd het effect van de herbiciden paraquat,
diquat, 2,4-D en de twee uitvloeiers nagegaan op de larven van
de kleine modderkrab Rhithropanopeus harrisii. Herbiciden, en
in het bijzonder 2,4-D worden immers reeds zeer frequent in
estuaria aangewend (HOLLISTER & WALSH, 1973).

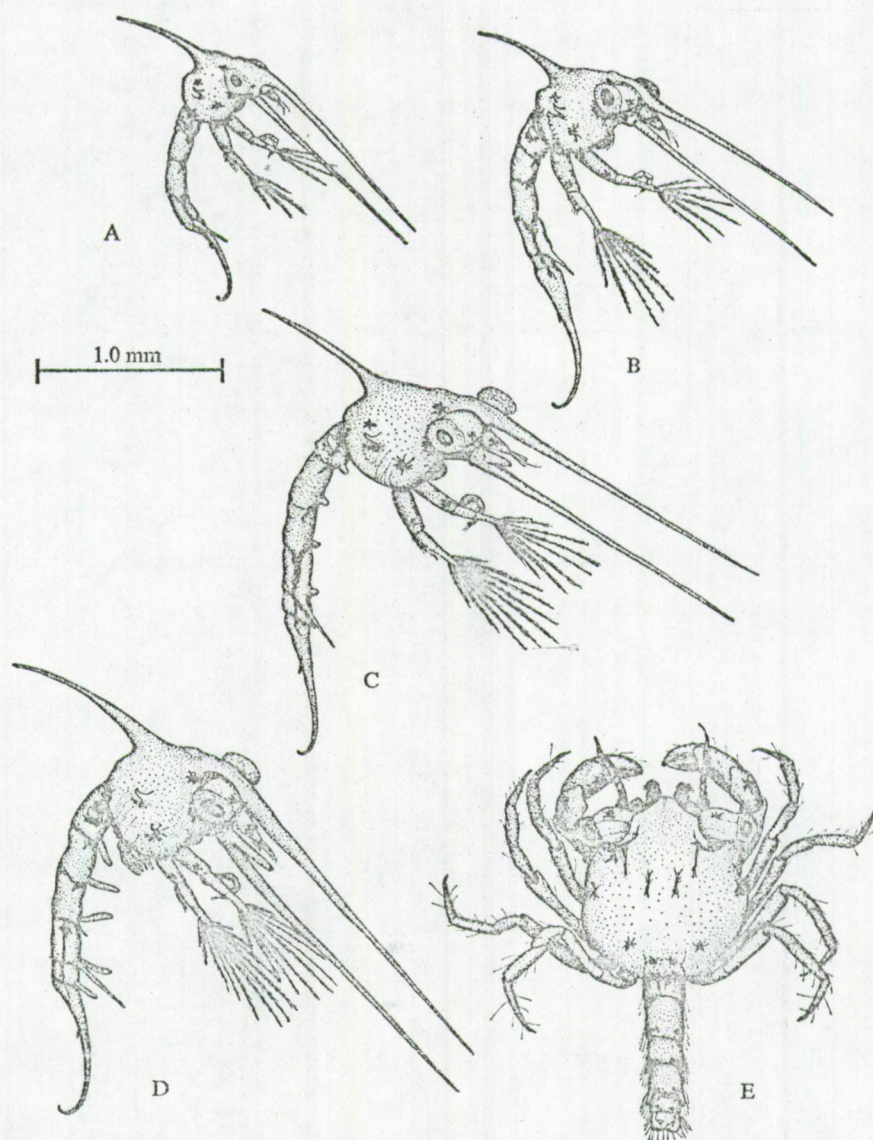
Dit onderzoek werd uitgevoerd in september-oktober
1974 in het Duke University Marine Laboratory te Beaufort
(North Carolina, USA).

We hebben deze vertegenwoordiger der Decapoda -
Xanthidae uitgekozen omdat 1) de larven in deze periode van
het jaar gemakkelijk kunnen verkregen worden en 2) precies in
dit laatste laboratorium een optimale kweekmethode voor deze
krablarven ontwikkeld werd. Inderdaad het gebruik van Bra-
chyura-larven als testorganismen voor toxiciteitsonderzoek is
pas mogelijk nadat, én een kweektechniek op punt gesteld is
en de voornaamste factoren die overleving en ontwikkeling
bepalen, gekend zijn.

Tot in 1960 slaagde men er meestal niet in de larven
na de 1ste en 2de vervelling in leven te houden in het labora-
torium. COSTLOW & BOOKHOUT (1959, 1960, 1961) ontwikkelden
echter een nieuwe methode voor het bestuderen van de larvale
ontwikkeling van Callinectes sapidus (1959), Hepatus epheliti-
cus (1960), Menippe mercenaria, Pilumnus sayi, Portunus gibbe-
sii en Panopeus herbstii (1961). COSTLOW, BOOKHOUT & MONROE
(1960, 1962) stelden hierbij vast dat de temperatuur en de
saliniteit de kritische factoren zijn die, wanneer ze optimaal
gehouden worden, een regelmatige vervellingsfrequentie van de
zoeae garanderen.

5.4.3.2. Gegevens over het proeforganisme

De kleine modderkrab Rhithropanopeus harrisii Gould
(karapaxbreedte van een adult : 15 mm ; lengte van een pasge-
boren larve : 1 mm) is algemeen verspreid in de estuaria zowel
aan de westkust als de oostkust van de Verenigde Staten. Het
normale geografische verspreidingsgebied is echter beperkt tot
de brakke waters langs de Atlantische Oceaan en de Mexikaanse



Figuur 40 : Larvale stadia van Rhithropanopeus harrisii GOULD
(naar COSTLOW & BOOKHOUT, 1971).

Golf. Deze krab komt ook op verschillende plaatsen in Europa voor : in Øresund bij Copenhagen (Denemarken) (COSTLOW, BOOKHOUT & MONROE, 1966), in de Zuiderzee (Nederland) en in een dode arm van de Vistula-rivier (Polen) (TUROBOYSKI, 1973).

Deze species die volgens COSTLOW & BOOKHOUT (1969) biezonder geschikt is voor labo-experimenten wordt gekarakteriseerd door 5 larvale stadia : 4 zoeae en 1 megalopa (zie Figuur 40).

Temperatuur en saliniteits-range voor overleving en ontwikkelingsduur werden achterhaald door COSTLOW, BOOKHOUT & MONROE (1966) ; COSTLOW & BOOKHOUT (1971) en CHRISTIANSEN & COSTLOW (1975).

5.4.3.3. Isolatie van de larven voor de bioassays

In de nabijheid van het laboratorium werden eierdragende wijfjes verzameld en verder in leven gehouden in grote schalen gevuld met gefilterd zeewater van 20‰ saliniteit. Het water, waarvan de temperatuur konstant gehouden werd op $23.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, werd dagelijks ververs. Deze saliniteit-temperatuur-kombinatie is volgens COSTLOW et al. (1966) optimaal voor de krablarven. De saliniteit werd aangepast door natuurlijk zeewater te verdunnen met gedestilleerd water. Na de "hatching" werden de zoea-larven van de adulte krab geïsoleerd en zo vlug mogelijk gebruikt voor het opzetten van de bioassays.

5.4.3.4. Bioassay-techniek

Voor de bioassays werden per concentratie toxikans 5 opeengestapelde glazen schalen gevuld met 25 ml zeewater (20‰ saliniteit) elk met 10 larven. De larven werden gekubeerd in een kweekkamer bij $23.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ en bij een fotoperiode van 12 uur licht en 12 uur donker. De larven werden dagelijks in nieuw medium overgebracht en gevoed met ± 20 pas ontloken Artemia-nauplii. De mortaliteit en het aantal vervellingen werden opgetekend. Teneinde kanibalisme te voorkomen werden de larven bij het bereiken van het megalopa stadium individueel overgebracht in plastieken vierkantige kweekbakken onderverdeeld in kompartimenten (1 kompartiment bevat 5 ml me-

ppb	100000	10000	1000	100	50	10	5	1	0.5	0.1	TL ₅₀
PMU	100	100	100	100		59.2 54.3 70.2	61.2	25.3 31.9	28.6		4.6
PZU	100	100	100	100	100	86.4 91.3	59.8 88.9	49.3 66.0	23.9	57.7	0.86
diquat						83.0		53.2			0.82
2,4-D				36.2		40.4		23.4			100
lissa- pol NX		100	36.0	31.3		12.7					1240
etho- meen S25				44.0		6.7		0.0		4.0	130

Tabel 28: Procent mortaliteit t.o.v. de blanco gedurende de totale embryonale ontwikkeling van Rhithropanopeus harrisii.

dium). Dagelijks werd het medium verversd en kregen de larven + 15 Artemia-nauplii als levend voedsel.

Met paraquat met uitvloeiers werden drie replikaties met elk 5x10 larven per concentratie uitgevoerd ; met paraquat zonder uitvloeiers twee replikaties en met de andere produkten kon door tijdsgebrek de proef niet meer herhaald worden.

De resultaten van de opeenvolgende proeven werden als gemiddelde uitgerekend en de TL_{50} -waarden bepaald zoals voor Daphnia en Artemia.

5.4.3.5. Resultaten

I. Mortaliteit gedurende de totale larvale ontwikkeling en de procentuële verdeling over de verschillende stadia (4 zoea, 1 megalopa)

Tabel 28 geeft de gemiddelde mortaliteit en de TL_{50} -waarden voor de verschillende produkten weer.

- Voor paraquat met uitvloeiers vonden we voor de concentraties 100, 10 en 1 ppb een mortaliteit t.o.v. de blanco van respectievelijk 100%, 61.2% en 28.6%. De TL_{50} -waarde voor PMU bedraagt bijgevolg 4.6 ppb. Voor paraquat zonder uitvloeiers bedroeg de totale mortaliteit voor de concentraties 100, 50, 10, 5, 1 en 0.1 ppb respectievelijk 100%, 100%, 88.9%, 59.8%, 57.7% en 23.9%. De berekende TL_{50} -waarde voor PZU is 0.86 ppb.
- De uitvloeiers lissapol NX en ethomeen S25 zijn 100 à 1000 maal minder toxisch dan het herbicide zelf. De concentraties 10000, 1000, 100, 10 ppb lissapol NX veroorzaakten respectievelijk 100%, 36.0%, 31.3% en 12.7% totale mortaliteit. De TL_{50} bedraagt 1240 ppb of 1.24 ppm. Voor ethomeen S25 werd in de hoogste uitgeteste concentratie (100 ppb) slechts 44.0% mortaliteit waargenomen. De mortaliteit in 10, 1 en 0.1 ppb bedroeg respectievelijk 6.7%, 0% en 4.0% ; m.a.w. ze is ongeveer gelijk te stellen aan deze in de blanco. Door lineaire extrapolatie op logaritmisch-probabiliteitspapier werd de TL_{50} -waarde geschat op 130 ppb. Men kan dus bijgevolg stellen dat lissapol NX ongeveer 10 maal minder toxisch is dan ethomeen S25.

Tabel 29 procentuele mortaliteit in de opeenvolgende embryonale stadia (4 zoea-larven, 1 megalopa) van R.harrisii.

blanko	I 64.3 II 28.9 III 1.9 IV 3.9 M 0.9									
ppb	100000	10000	1000	100	50	10	5	1	0.5	0.1
PMU	I 100 II III IV M	100	100	100		75.3 20.7 3.0 1.0 0.0		66.0 30.4 3.6 0.0 0.0		
PZU	I 100 II III IV M	100	100	100	100	83.6 15.4 0.0 0.0 0.0	90.7 7.0 0.0 0.0 2.3	74.0 20.5 0.0 2.7 2.7	97.1 2.7 0.0 0.0 0.0	
Diquat	I II III IV M					71.7 28.3 0.0 0.0 0.0		82.0 15.4 0.0 2.6 0.0		
2,4-D	I II III IV M			51.4 48.6 0.0 0.0 0.0		69.4 30.6 0.0 0.0 0.0		68.7 25.0 6.3 0.0 0.0		
Ethomeer S 25	I II III IV M			60.0 33.3 0.0 0.0 6.6		51.7 34.5 3.4 6.9 3.4		70.0 20.0 0.0 0.0 10.0		64.3 14.3 0.0 14.3 7.1
Lissa- polNX	I II III IV M	96.7 3.3 0.0 0.0 0.0	88.9 0.0 0.0 11.1 0.0	73.2 6.7 0.0 6.7 13.4		66.9 16.5 0.0 16.5 0.0				

- Van diquat werden slechts de concentraties 1 en 10 ppb uitgetest. De totale mortaliteit bedroeg respectievelijk 53.2% en 83.0%. De geëxtrapoleerde TL_{50} -waarde bedraagt 0.82 ppb. De toxiciteit van diquat kan men in ieder geval goed vergelijken met deze van paraquat zonder uitvloeiers.
- 2,4-D in de concentraties 100, 10 en 1 ppb veroorzaakt een totale mortaliteit van respectievelijk 36.2%, 40.4% en 23.4%. De TL_{50} -waarde is groter dan 100 ppb en kan met dit cijfermateriaal niet geëxtrapoleerd worden. Dit herbicide is waarschijnlijk minstens 100 maal minder toxisch dan de 2 dipyridyliums.

De resultaten van de experimentele opstellingen werden steeds vergeleken met een simultane blanco-opstelling. In deze blanco-opstellingen (3 replikaties van 50 parallellen), trad gemiddeld een totale mortaliteit op van 39.6%. Als percent voor de verschillende larvale ontwikkelingsstadia (4 zoeae en 1 megalopa), betekent dit 64.3% in zoea I, 28.9% in zoea II, 1.9% in zoea III, 3.9% in zoea IV en 0.9% in het megalopa stadium (Tabel 29).

Het Iste zoea-stadium is duidelijk het meest gevoelige stadium, gevolgd door het IIde stadium. De sterfte in het IVde zoea-stadium was significant hoger dan in het IIIde stadium en trad voornamelijk op juist voor of tijdens de vervelling naar megalopa. De megalopa's zelf zijn zeer resistent.

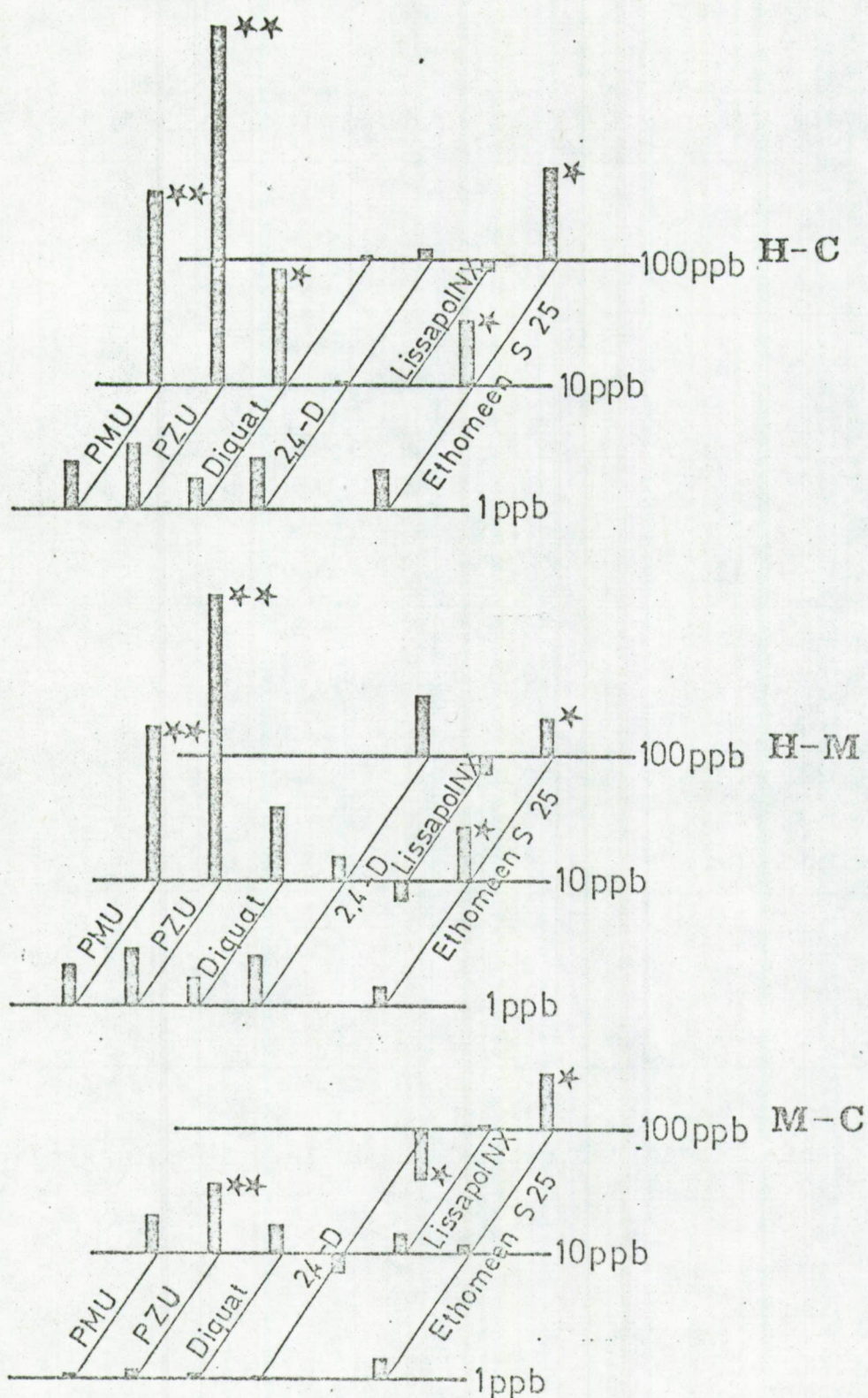
De procentuële verdeling van de mortaliteit voor de verschillende stadia verschilt in de experimentele opstellingen nagenoeg niet van het normale patroon in de blanco. In de hoogste concentraties toxikans vond men in vergelijking met de lagere concentraties doorgaans de hoogste mortaliteit in stadium I en II. De hogere gevoeligheid van deze stadia is hiervan de reden, zodanig dat alle larven reeds afgestorven waren vooraleer het IIIde stadium werd bereikt. Zoea III en megalopa waren steeds zoals in de blanco-opstelling het minst gevoelig, behalve voor ethomeen S25. Deze uitvloeier met een TL_{50} -waarde van "130"ppb, had een zeer duidelijk dodelijk effect op de anders zeer resistente megalopa-larven tot in een concentratie van 0.1 ppb.

ppb	100000	10000	1000	100	50	10	5	1	0.5	0.1
PMU	H-C	0.0	0.0	0.0		38.8		70.3		
	H-M					38.8		70.3		
	M-C					100		100		
PZU	H-C	0.0	0.0	0.0	0.0	11.2	40.2	42.2	67.2	
	H-M					12.1		44.4	-	
	M-C					93.1		96.8		
Diquat	H-C					17.1		46.9		
	H-M					17.1		46.9		
	M-C					100		100		
2,4-D	H-C			64.0		59.7		76.8		
	H-M			64.0		59.7		76.8		
	M-C			100		100		100		
Lissa-pol NX	H-C		64.0	72.9		87.2				
	H-M		64.0	72.9		87.2				
	M-C		100	100		100				
Ethomeen S 25	H-C			54.2		90.3		103.3		95.5
	H-M			56.8		92.9		105.8		95.5
	M-C			95.5		97.2		97.6		97.3

Tabel 30 : Procent larven t.o.v. de blanko dat zich ontwikkelt van "hatch" (H) tot 1°krab (C), van "hatch" tot megalopa (M) en van megalopa tot 1°krab.

ppb	1000	100	50	10	5	1	0.5	0.1
PMU H-C				3.09*		0.67		
H-M				2.48*		0.63		
M-C				0.61		0.04		
PZU H-C				5.76*		1.06		
H-M				4.62*	0.99*	0.92	-0.02	
M-C				1.14*		0.14		
Diquat H-C				1.84*		0.51		
H-M				1.20		0.44		
M-C				0.64		0.08		
2,4-D H-C		0.15		0.05		0.81		
H-M		0.96		0.34		0.81		
M-C		-0.79*		-0.29		0.0		
Lissa-H-C	0.49	-0.15		0.0				
polNX H-M	0.32	-0.21		-0.32				
M-C	0.17	0.06		0.32				
Etho- H-C		1.50*		1.01*		0.62		0.24
neen H-M		0.60*		0.87*		0.30		0.12
S 25 M-C		0.90*		0.14		0.31		0.12

Tabel 31: Aantal dagen vertraging van de larvale ontwikkeling van R.harrisii t.o.v. de blanco.



Figuur 41 : Effekt van PMU, PZU, lissapol NX, ethomeen S25, diguat en 2,4-D op de duur van de larvale ontwikkeling van Rhithropanopeus harrisii.

II. Sukses van de larvale ontwikkeling en verandering van de duur van deze processen onder invloed van toxikanten

Tabel 30 geeft het procent larven weer dat zich ontwikkelt, van "hatch" tot het megalopa-stadium, van "hatch" tot het 1ste krab-stadium, en van megalopa tot 1ste krab-stadium. Deze procenten zijn berekend t.o.v. de blankowaarden.

In Tabel 31 en Figuur 41 wordt het aantal dagen vertraging van deze processen t.o.v. de respektievelijke blanco weergegeven. Signifikante verschillen met de blanco zijn aangeduid met asteriksen.

Het niet volledig doorlopen van de totale larvale ontwikkeling is bij de experimenten met deze herbiciden en detergenten steeds te wijten aan vroegtijdig afsterven van de larven. Het % sukses van de ontwikkeling van hatch tot het megalopa-stadium resumeert bijgevolg de mortaliteit gedurende de 4 zoea-stadia. Het % sukses van de ontwikkeling van megalopa tot 1ste krab is funktie van de mortaliteit gedurende het megalopa-stadium. Voor geen enkel van de uitgeteste producten, in de door ons gebruikte concentraties wordt de vervelling naar het volgende larvale stadium geblokkeerd. Wel komt er in sommige gevallen een significante vertraging van de processen voor (Figuur 41).

In de gegeven proefomstandigheden ($20^{\circ}/_{\infty}$, 23.5°C) was in de blanco-opstellingen de totale ontwikkelingsduur van "hatch" tot 1ste krab gemiddeld 19.37 dagen (3 herhalingen van 50 parallellen), waarbij de ontwikkeling van "hatch" tot megalopa gemiddeld 13.34 dagen duurde en van megalopa naar 1ste krab 6.03 dagen.

Met PMU vindt men bij 10 ppb (3 herhalingen), een significante ($p < 0.01$) vertraging van de totale larvale ontwikkeling van 3.09 dagen, en meer specifiek een verlenging van de zoea-stadia van 2.48 dagen. Er is geen significante vertraging van de ontwikkeling van megalopa naar 1ste krab. Bij 1 ppb trad nergens een significante vertraging op.

Voor PZU zijn de gegevens voor 5 en 0.5 ppb onvolledig ; de larvale ontwikkeling werd slechts gevolgd tot het megalopa-stadium. Bij 5 ppb werd de ontwikkeling tot megalopa-

pa significant vertraagd ($p < 0.05$) ; bij 0.5 ppb niet. Bij 10 ppb (2 herhalingen) werd de volledige ontwikkeling significant vertraagd met 5.76 dagen, de ontwikkeling tot megalopa met 4.62 dagen en de ontwikkeling van megalopa tot 1ste krab met 1.14 dagen. Bij 1 ppb trad geen significante vertraging op.

Opnieuw moet men vaststellen dat PZU een groter effect heeft dan PMU, ditmaal met als criterium het sukses en de duur van de larvale ontwikkeling van R. harrisii-larven.

Met de uitvloeier lissapol NX werd in geen enkele concentratie een significante verandering in de ontwikkelingsduur waargenomen. Met 100 ppb ethomeen S25 werd de totale ontwikkeling significant ($p < 0.05$) vertraagd met 1.50 dagen ; van hatch tot megalopa met 0.62 dagen en van megalopa tot 1ste krab met 0.92 dagen. Met 10 ppb ethomeen S25 werd de totale ontwikkeling significant vertraagd met 1.01 dagen vanwege de vertraging van de ontwikkeling van de zoea-larven met 0.87 dagen. Ethomeen S25 is het enige uitgeteste produkt waarbij in bepaalde concentraties de ontwikkeling van de megalopa tot 1ste krab méér wordt vertraagd dan de ontwikkeling van de 4 zoea-stadia. Rekening houdend met de gegevens over de mortaliteit in het megalopa-stadium, wordt het duidelijk dat de megalopa van R. harrisii speciaal gevoelig is voor dit detergent.

Diquat is wat betreft de invloed op het sukses van de larvale ontwikkeling van R. harrisii zeer homolog met PZU. De duur van de ontwikkeling wordt in tegenstelling met PZU minder beïnvloed. Alleen bij 10 ppb wordt de totale ontwikkeling significant ($p < 0.05$) vertraagd met 1.84 dagen.

2,4-D beïnvloedt het sukses en de duur van de larvale ontwikkeling slechts op geringe wijze. Een zeer belangrijke waarneming is evenwel de significante ($p < 0.05$) "versnelling" van de ontwikkeling van megalopa tot 1ste krab bij 100 ppb. Bij 10 ppb is eveneens een versnelling waar te nemen, maar deze is niet significant.

5.4.3.6. Bespreking van de resultaten

Uit onze proeven kan men volgende vaststellingen afleiden :

1) De dipyridylumderivaten zijn het meest toxisch voor R. harrisii : de TL_{50} -waarde voor diquat, paraquat met en zonder uitvloeiers is respectievelijk : 0.82, 4.6 en 0.86 ppb.

De laagste TL_{50} -waarde voor paraquat uit de literatuur werd gerapporteerd door WILSON & BOND (1969) voor de adulte amphipode Hyalella azeteca na 96 uur : 48 ppb. BURNET (1972) konkludeert uit zijn veldonderzoek dat vooral amphipoden zeer gevoelig zijn voor dit type herbicide.

De TL_{50} -waarde voor 2,4-D is >100 ppb. R. harrisii-larven blijken evenwel veel gevoeliger voor 2,4-D dan andere crustaceeën (SANDERS, 1970 ; HANSEN et al., 1973). Dit herbicide, in feite een groeihormoon voor planten (zie 4.2.2.), heeft in vergelijking met de dipyridylum herbiciden slechts een kleine invloed op de sterfte van de krablarven (in het IVde zoea-stadium en in het megalopa-stadium is de mortaliteit gelijk aan nul). RAWLS (1965) vond voor juveniele "blue crabs" (Callinectes sapidus) slechts een reactie vanaf 5 ppm 2,4-D. Het subletale effect op de ontwikkelingsduur van R. harrisii is echter interessant (zie verder).

Van de uitgeteste produkten blijken de R. harrisii-larven het minst gevoelig te zijn voor de detergenten. De TL_{50} -waarden voor ethomeen S25 en lissapol NX zijn respectievelijk : >100 ppb en 1240 ppb (= 1.24 ppm).

2) Voor alle uitgeteste produkten zijn de eerste larvale stadia van R. harrisii het gevoeligst. Gerangschikt volgens afnemende gevoeligheid : I>II>IV>III>M. Ethomeen S25 en lissapol NX maken hierop een uitzondering : I>II>M>IV>III.

Bij de regenboogforel Salmo gairdneri vond MARCHETTI (1965) een verband tussen de ontwikkelingsstadia met hoogste waterpermeabiliteit en de grootste gevoeligheid voor lissapol NX. SWEDMARK et al. (1971) toonden aan dat crustaceeën gevoeliger zijn voor detergenten tijdens het vervellen dan in andere stadia.

Wij beschikken over geen gegevens in verband met de waterpermeabiliteit van de krablarven. In elk geval zijn de beide reeksen rangorden van larvale stadia volgens afnemende gevoeligheid voor de uitgeteste produkten niet in overeenstemming met de experimenten van BOOKHOUT et al. (1972) waarin de hoogste sterfte optreedt tijdens het megalopa-stadium. De werkingswijze van het pesticide speelt hierbij een grote rol. Er wordt aangenomen dat het vetoplosbare Mirex waarmee voornoemde auteurs werkten in het vet van de R. harrisii-larven werd gestockeerd gedurende de zoea-stadia en pas in het megalopa-stadium in het bloed worden vrijgegeven.

3) Geen van de uitgeteste produkten legt de larvale ontwikkeling van R. harrisii stil ; wel treedt er voor sommige produkten een significante verandering in de duur van de verschillende ontwikkelingsstadia op.

Paraquat met en zonder uitvloeiers en diquat hebben een analoge werking ; zowel de zoea-stadia als het megalopa-stadium worden vanaf 10 ppb van deze herbiciden sterk geremd. Paraquat is toxischer voor R. harrisii dan diquat in tegenstelling met de resultaten voor Daphnia en Artemia. Ook wat betreft hun fytotoxische potentie is diquat een giftiger produkt dan paraquat. Toevoeging van uitvloeiers aan paraquat vermindert het effect van het herbicide.

Verwacht wordt dat ook de detergenten zelf de larvale ontwikkeling vertragen (BELLAN et al., 1972). De uitvloeier lissapol NX heeft tot 1000 ppb geen significante invloed op de larvale ontwikkelingsduur. Zowel het letaal als het subleetaal effect van dit detergent is slechts gering in vergelijking met de andere produkten.

Ethomeen S25 remt de larvale ontwikkeling van deze decapoden-larven : 10 ppb vertraagt de ontwikkeling van de zoea-larven op significante wijze ; 100 ppb vertraagt daarbij ook de ontwikkeling van de megalopa-larve, en zelfs meer dan dat de 4 zoea-stadia samen worden verlengd. De megalopa-larven zijn dus biezonder gevoelig voor dit detergent zowel wat betreft de mortaliteit als wat betreft het vertragend effect op de ontwikkeling.

2,4-D verlengt de ontwikkelingsduur van de zoea-larven reeds vanaf de laagste uitgeteste concentratie (1 ppb). De ontwikkeling van de megalopa-larve wordt daarentegen versneld door 10 en 100 ppb van dit produkt. Bij 100 ppb gebeurt dit op statistisch significante wijze.

2,4-D, een groeiregulator voor plantaardig materiaal, veroorzaakt een verhoogde syntese van ribosomale RNA en eiwitten, wat gepaard gaat met een massale celproliferatie (ASHTON & CRAFTS, 1973) (zie 4.2.2.). Waarschijnlijk is dit mechanisme ook toepasselijk op dierlijke organismen. COPE et al. (1970) vonden bij stijgende concentraties 2,4-D een zeer significante vertraging in het kuitschieten van de "Bluegill"-vis (Lepomis macrochirus). De omvang van het broed was dezelfde als voor de blanco maar in de range 0.1-10 ppm was de groei der larven sneller en recht evenredig met de toegevoegde dosis 2,4-D (0.1-10 ppm).

SOMERS et al. (1974) vinden analoge resultaten met jonge kuikens uit eieren die uitwendig met 2,4-D werden behandeld. Het effect is daarbij sex-gebonden: de vrouwelijke kuikens groeien normaal, de mannelijke kuikens wegen na 4 weken significant meer dan de controles. Anderzijds blijken de bevruchte eieren en de vroege embryonale stadia van vissen (HIL-TIBRAN, 1967) en mollusken (DAVIS, 1961) minder gevoelig te zijn voor 2,4-D dan de larven.

Daarom is de tegengestelde invloed van 2,4-D op de ontwikkeling van de zoea-larven en de megalopa-larve dus minder tegenstrijdig dan op het eerste zicht kan blijken.

De groeiregulerende werking van 2,4-D is bovendien nauw verbonden met de dosis toegevoegd hormoon.

4) Er bestaat ten slotte een interessante interactie tussen de detergenten en het herbicide paraquat.

In het geval van de combinatie van 20% paraquat met 10% uitvloeiers ethomeen S25 plus lissapol NX wordt de mortaliteit van de larven van R. harrisii sterk verminderd (TL_{50} voor PZU en PMU respectievelijk 0.86 en 4.6 ppb) en vermindert de vertragende aktie van paraquat op de ontwikkeling van de decapoden-larven (de totale ontwikkeling wordt vertraagd met PZU en PMU respectievelijk met 5.76 en 3.09 dagen).

De interactie tussen produkten in combinatie wordt dikwijls op een indirecte manier veroorzaakt, vnl. als één van de componenten de reactie van de organismen beïnvloedt, zodanig dat ze langer of effectiever (of omgekeerd) in kontakt komen met de mogelijks meer toxische komponent (MUIRHEAD-THOMSON, 1971).

GIBALDI & FELDMAN (1970) citeren in dit verband verschillende onderzoeken die aantonen dat detergenten de membraanpermeabiliteit voor een reeks produkten verhogen, zoals barbituraten, salicylzuur, ethanol, thiourea, insuline en antibiotica.

Deze werking van detergenten werd achteraf ook bevestigd door BRAATEN et al. (1972) en door ABEL (1974).

In het geval van toxiciteitstesten met R. harrisii stellen we echter vast dat er een antagonistische werking tussen de uitvloeiers en het herbicide optreedt. Blijkbaar zijn de krablarven, naargelang het stadium, verschillend beschermd tegen de verandering in membraanpermeabiliteit veroorzaakt door de uitvloeiers.

Het toevoegen van 10% uitvloeiers verhoogt de doorlaatbaarheid voor paraquat van het ecto- en endodermale oppervlak van het organisme niet. Integendeel, de uitvloeiers inhiberen de paraquat-absorptie. Dit kunnen we verklaren doordat de detergenten in een competitieve positie komen te staan t.o.v. het paraquat, voor wat betreft de opname door de krablarven, en wel voor volgende redenen :

- 1) de detergenten vertonen als algemeen kenmerk een concentratie aan oppervlakken.
- 2) één van de twee detergenten, nl. ethomeen S25 heeft dezelfde lading als de paraquat-ionen.

Bovendien zijn R. harrisii-larven veel minder gevoelig voor detergenten dan voor herbiciden, zowel wat betreft de mortaliteit als het subleetaal effect op de ontwikkelingsduur.

Op gebied van toxiciteit van mengsels van produkten moet echter nog heel wat specifiek onderzoek worden uitgevoerd vooraleer we een duidelijk overzicht zullen hebben van alle mogelijke interacties (zie Hoofdstuk 6).

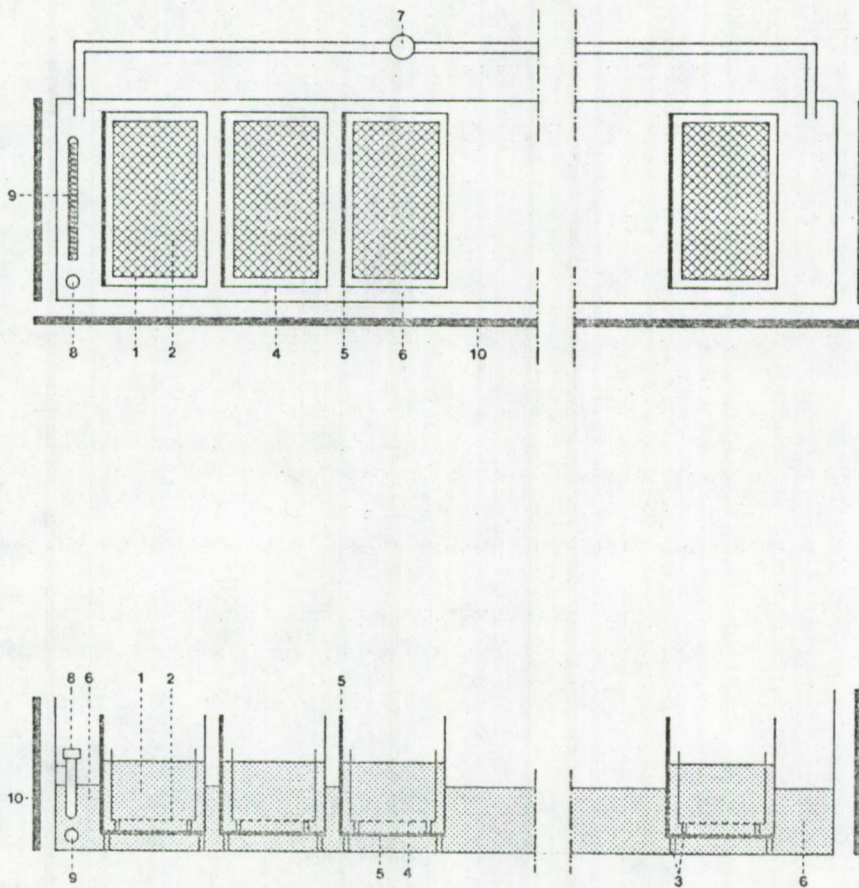


Fig. 1. Spawning chambers. Upper figure, top view; lower figure, side view. 1, breeding trap; 2, sieve in stainless steel; 3, resting points; 4, breeding chamber; 5, opaque wall; 6, water bath; 7, pump; 8, thermostat; 9, heating element; 10, screen.

Figuur 42 : "Breeding trap" voor vissen (naar MERTENS, 1973).

5.5. Toxiciteitsonderzoek op vissen

5.5.1. Gegevens over de gebruikte soorten en kweekomstandigheden

5.5.1.1. Brachydanio rerio

Brachydanio rerio is een ovipare akwariuvis, afkomstig uit tropische zoetwaters in Zuid-Oost-Azië.

In het laboratorium werd voor de vissen, bestemd als testorganismen voor de bioassays, een stock onderhouden in leidingswater bij 26°C. De vissen bestemd voor kweek en reproductie werden bij kamertemperatuur (18-20°C) gehouden. De fotoperiode was 12 u duister en 12 u licht. De vissen werden gevoed met een commercieel vismeel Tetramin^I, regelmatig afgewisseld met levend voedsel zoals ciliaten en mikrocrustaceën.

De betrokken soort kan het hele jaar door gemakkelijk in het laboratorium worden gekweekt. De paring en het kuitschieten worden geïnduceerd door een verhoogde temperatuur, 26°C t.o.v. kamertemperatuur en helder water (MERTENS, 1973). Daarom werden de koppeltjes vissen uit de stock bij kamertemperatuur geïsoleerd in een "breeding-trap" met artificieel zacht water volgens de formule van CAIRNS (1969) bij 26°C (MERTENS, op.cit.) (zie Figuur 42). Een adult wijfje kan op die manier om de twee weken 50-600 eieren produceren (ABEDI & McKINLEY, 1968). De afgelegde eitjes worden uitwendig bevrucht. Levende eieren zijn doorschijnend zodat de ontwikkeling gemakkelijk kan gevolgd worden. Ongeveer 30 uur na het afleggen begint het hart te slaan en begint het embryo zich te bewegen (SKIDMORE, 1966). Na 3 dagen beginnen de larven uit te sluipen (HISAOKA & BATTLE, 1958).

De adulte vissen werden onmiddellijk nadat de eieren werden afgelegd, uit de "breeding-trap" verwijderd. De bevruchte eitjes werden pas 24 u na het afleggen in een petrischaal met zacht water van CAIRNS geïsoleerd. Eens ontloken werden de larven overgebracht in vers medium en gevoed met kulturen van Paramecium en oudere stadia met Artemia-nauplii. Onder de gegeven omstandigheden waren de visjes na een 20-tal weken volwassen.

I. Tetra Werke, Melle, Duitsland, ref.N° 14150.

5.5.1.2. Poecilia reticulata PETERS

Dit visje, beter gekend onder de naam guppy of miljoenenvisje, behoort tot de levendbarende tandkarpers. Zijn oorspronkelijk verspreidingsgebied is het Noord-Westelijk deel van Zuid-Amerika. Momenteel treft men de guppy zowat overal aan, zowel in zoetwater als in brakwater en zelfs in zeewater. In Europa is zijn verspreiding beperkt tot Centraal-Engeland (BLANC et al., 1971).

In het laboratorium werden de proefdieren in stock gehouden in leidingswater bij 26°C. De voeding en belichting waren dezelfde als voor B. rerio. Mannetjes en wijfjes vertonen een duidelijk geslachtsdimorfisme. Na de bevruchting ontwikkelen de eitjes zich in de geslachtsklier van het wijfje. De wijfjes werden 25 dagen na de bevruchting afgezonderd in een "breeding-trap" bij 26°C in zacht water volgens CAIRNS. Na 5 à 10 dagen werden 30 à 60 juvenielen afgelegd. Deze visjes groeiden snel en waren na 3 maand volwassen.

5.5.2. Bioassay-techniek

5.5.2.1. Proeven op adulte vissen (B. rerio en P. reticulata)

De testorganismen werden 24 uur vóór de aanvang van de proef aan volgende testkondities geakklimatiseerd :

- temperatuur 26°C
- matige belichting met fotoperiode van 12 uur licht en 12 uur duister
- zacht water van CAIRNS.

De bioassays werden uitgevoerd in glazen akwaria met een nuttige inhoud van 2 liter. De testconcentraties werden gekozen als beschreven in 5.4.1.3. Voor elke concentratie van het toxikans werden 10 vissen gebruikt. In de proeven die 96 uur duurden werden de vissen niet gevoederd. Dode vissen werden zo vlug mogelijk verwijderd en de mortaliteit genoteerd.

Elke dag werd de pH en het zuurstofgehalte gecontroleerd. De opgeloste zuurstof in de testvloeistof mag immers niet beneden de 4 ppm dalen (SCHRECK & BROUHA, 1975). In onze proeven werden TL₅₀-waarden na 24, 48, 72 en 96 uur berekend zoals in voorgaande toxiciteitstesten.

5.5.2.2. Proeven op eieren van B. rerio

Van Brachydanio rerio kunnen alleen embryos in het laat blastula- of vroeg gastrula-stadium worden gebruikt voor de bioassays, omwille van de hoge mortaliteit in de jongere stadia (HISAOKA & BATTLE, op.cit.). Daarom lieten wij de eieren 24 uur inkuberen alvorens ze per 10 in steriele petrischaaltjes (4 cm diameter) over te brengen, gevuld met 10 ml testoplossing. De eieren werden eerst in de korresponderende testverduunning gespoeld. De schaaltes werden geïnkubeerd bij een konstante temperatuur van 26°C en een matige belichting met fotoperiode van 12 uur licht en 12 uur donker.

Bij het opstellen van de proef werden meestal slechts eieren van één enkel wijfje gebruikt. Indien de verschillende "batchen" toch dienden gemengd te worden, werden de eieren willekeurig (GADDUM, 1953) over de verschillende proefopstellingen verdeeld. De schaaltes werden in de eerste 4 uur van de proef om het uur gecontroleerd en de dode eieren werden verwijderd. Daarna werd de mortaliteit met intervals van 24 uur gecontroleerd. Na een testduur van 72 uur waren opnieuw meerdere controles nodig omdat de larven dan begonnen uit te komen. Het criterium voor dood, was het ontbreken van lichaamsbewegingen van het embryo, het stoppen van de hartslag en de bloedcirkulatie (ROALES & PERLMUTTER, 1974). TL₅₀-waarden werden berekend na 24, 48 en 72 uur.

5.5.2.3. Proeven op larven van B. rerio

Na een rustperiode van 24 uur werden de Brachydanio-eieren overgebracht in een grote petriplaat (diameter 14 cm) met zacht water van CAIRNS. Deze plaat werd geïnkubeerd bij een konstante temperatuur van 26°C en een matige verlichting met een fotoperiode van 12 uur licht en 12 uur donker. Het juiste tijdstip waarop de larven ontsloopen werd genoteerd.

Deze pas uitgekomen larven werden per 10 verdeeld over steriele petrischaaltjes met 10 ml testoplossing. Zoals voor de eieren werden de larven eerst gespoeld in de korresponderende testverduunning.

Tijdens de eerste 6 uur werden de schaaltsjes om het uur gecontroleerd en werden de dode larven verwijderd. Nadien werden ze slechts om de 24 uur gecontroleerd. Het criterium voor mortaliteit was het stoppen van de hartslag en de bloed-cirkulatie.

De toxiciteitsproeven met Brachydanio-larven werden uitgebreid met een tweede reeks bioassays waarbij ook de eieren reeds in de testoplossing geïnkubeerd werden i.p.v. in artificieel zoetwater. Voor beide reeksen werden TL_{50} -waarden berekend na 24, 48, 72 en 96 uur.

5.5.3. Resultaten van de bioassays op adulte vissen

De $TL_{50}^{24-48-72-96}$ voor beide soorten worden weergegeven in Tabel 32.

Brachydanio rerio

	TL_{50} in ppm			
	24	48	72	96
PMU	7.5	7.5	7.5	7.5
PZU	48.5	48.5	48.5	48.5
lissapol NX	5	5	5	5
ethomeen S25	2.9	2.4	2.3	2.3
diquat	56	45	35.5	23.5
2,4-D	180	160	160	160

Poecilia reticulata

PMU	18	16.5	15	15
PZU	50	39	28.5	22
lissapol NX	13.5	13.5	13.5	12.5
ethomeen S25	2.4	2.4	2.4	2.4
diquat	48	28.5	22.5	18
2,4-D	630	580	540	520

Tabel 32 : $TL_{50}^{24-48-72-96}$ -waarden bij adulte B. rerio en P. reticulata.

In al deze experimenten daalde het gehalte aan opgeloste zuurstof niet beneden de 4 ppm en schommelde de pH in de blanco en testoplossingen tussen 7.5 en 8.5 gedurende het gehele verloop van de proef.

5.5.4. Bespreking van de resultaten

Het is opvallend dat de resultaten bekomen met de twee vissoorten kwasi analoog zijn voor PZU, ethomeen S25 en diquat. Voor lissapol NX en PMU is dit minder het geval en voor 2,4-D zijn de resultaten voor beide vissoorten nogal afwijkend. In elk geval blijft de rangorde in toxiciteit dezelfde.

Voor Brachydanio rerio is deze rangorde in toxiciteit van hoog naar laag na 24 uur :

ethomeen S25 > lissapol NX > PMU > PZU > diquat > 2,4-D
en vanaf 48 uur tot 96 uur :

ethomeen S25 > lissapol NX > PMU > diquat > PZU > 2,4-D
Voor Poecilia reticulata is de rangorde gedurende de gehele proef :

ethomeen S25 > lissapol NX > PLU > diquat > PZU >> 2,4-D

Voor de uitgeteste produkten blijven de TL₅₀-waarden na 24, 48, 72 en 96 uur gelijk, met als uitzondering diquat waar het toxisch effect van diquat op Brachydanio rerio evenredig blijft stijgen in functie van de tijd. Met Poecilia reticulata verandert de gevoeligheid voor diquat vnl. na 24 uur.

Diquat is iets toxischer dan paraquat, zowel op Poecilia reticulata als op Brachydanio rerio. Dit stemt overeen met de gegevens van CARTER (1955), GILDERHUS (1967) en ALABASTER (1969) (zie Tabel 33).

SCHLÜTER (1969) vindt echter dat paraquat toxischer is dan diquat voor baars, spiegelkarper en voorn. Uit Tabel 33 blijkt dat dit ook het geval is voor "harlequin sunfish" (Rasbora heteromorpha) ALABASTER, 1961 ; ALABASTER, 1969) en "bluegill" (Lepomis macrochirus) (CARTER & WILLIAMS, 1968 ; SURBER & PICKERING, 1962 ; HUGHES & DAVIS, 1962 en GILDERHUS, 1967).

Tabel 33 : Vergelijking met literatuurgegevens van de TL₅₀-waarden van diquat en paraquat op vissen.

Species	uur	Diquat-ion TL ₅₀ (ppm)				Opm.	Referentie
		24	48	72	96		
<u>Salmo gairdneri</u> regenboogforel		90	16		8		CARTER, 1965
<u>Salmo gairdneri</u> regenboogforel					5,7		GILDERHUS, 1967
<u>Salmo gairdneri</u> regenboogforel	115 46	89 36				h.w. z.w.	ALABASTER, 1969
<u>Oncorhynchys tshawytscha</u> zalm	15	14.5					BOND et al., 1960 (A8)
<u>Esox lucius</u> snoek					8		GILDERHUS, 1967
<u>Carassius auratus</u> goudvis					18		GILDERHUS, 1967
<u>Lepomis macrochirus</u> Bleugill	209 46				209 37	h.w. z.w.	SURBER & PICKERING, 1962
<u>Lepomis macrochirus</u> Bluegill					18		GILDERHUS, 1967
<u>Lepomis macrochirus</u> Bluegill	267	76					HUGHES & DAVIS, 1962
<u>Rasbora heteromorpha</u> Harlequin fish	97	37				z.w.	ALABASTER, 1969
<u>Stizostedion vitreum vitreum</u> Walleyes					1.1		GILDERHUS, 1967
<u>Poecilia reticulata</u> Guppy	48	28.5	22.5		18	z.w.	CLAUS, 1976
<u>Brachydanio rerio</u> Zebravis	56	45	35.5		23.5	z.w.	CLAUS, 1976

(h.w. = hard water ; z.w. = zacht water),

Tabel 33 : Vervolg.

Paraquat-ion							
Species	uur	TL ₅₀ (ppm)				Opm.	Referentie
		24	48	72	96		
<u>Salmo gairdneri</u> regenboogforel	110		62		32		CARTER, 1965 (in CARTER & WILLIAMS, 1968)
<u>Salmo trutta</u>	57		30		13	h.w.	CARTER & WILLIAMS, 1968
<u>bruine forel</u>	57		30		13	z.w.	
(juvenielen)	22		17.5		12	h.w.)	+5% wetter
	16		13		10	z.w.)	
	7		5.4		4	h.w.)	+10%wetter
	4.7		4		2.5	z.w.)	
<u>Cyprinus carpio</u>			21.4				NIHON, Japan, 1966 (in CARTER & WILLIAMS, 1968)
karper			19.1				NAGOYA, Japan, 1966 (in CARTER & WILLIAMS, 1968)
<u>Lepomis macrochirus</u>	80		20				HUGHES, 1966 (in CARTER & WILLIAMS, 1968)
Bluegill							
<u>Rasbora heteromorpha</u>	72		32		23		ALABASTER, 1961 (in CARTER & WILLIAMS, 1968)
Harlequin sunfish							
<u>Rasbora heteromorpha</u>	17		12			h.w.	ALABASTER, 1969
Harlequin sunfish	46		33			z.w.	
	33		23			z.w.	
<u>Pimephales promelas</u>	23.3	23.3			23.3	PZU	SCHENK, 1966b (in CARTER & WILLIAMS, 1968)
Fathead minnows	4.25	4.1			4.1	PMU	
<u>Notropia atheroides</u>	69	33			10		SCHENK, 1966a (in CARTER & WILLIAMS, 1968)
Lake Imerald Shiner							
<u>Poecilia reticulata</u>	50	39	28.5		22	z.w.	CLAUS, 1976
Guppy							
<u>Brachydanio rerio</u>	48.5	48.5	48.5		48.5	z.w.	CLAUS, 1976
Zebravis							

In de reeks van testvissen vermeld in Tabel 33 zijn P. reticulata en B. rerio ongeveer de minst gevoelige soorten voor paraquat en ongeveer de meest gevoelige voor diquat.

De twee uitvloeiers die in de commerciële formulering gramoxone aan paraquat worden toegevoegd zijn zeer toxisch voor vissen. De combinatie met paraquat verhoogt de toxiciteit van dit produkt aanzienlijk. Het synergistisch effect van de detergenten met paraquat is veel belangrijker voor Brachydanio rerio dan voor Poecilia reticulata. Naast een mogelijke sterkere beïnvloeding van de paraquat-absorptie bij Brachydanio rerio dan bij Poecilia reticulata (cfr. 6.4.) kan dit verschil eveneens te wijten zijn aan de hogere eigen toxiciteit van lissapol NX voor Brachydanio rerio dan voor Poecilia reticulata.

Ook voor de bruine forel (Salmo trutta) vinden CARTER & WILLIAMS (1968), een sterke verhoging van de toxiciteit door toevoeging van detergenten. Tabel 34 geeft de resultaten weer voor 4 gramoxone-formuleringen en voor de 2 uitvloeiers afzonderlijk.

Bruine forel (<u>Salmo trutta</u>) adult	TL ₅₀ (ppm paraquat-ion)			
	6 u	24 u	48 u	96 u
PZU	-	57	30	13
PMU 10% uitvloeiers ethomeen S25 + lissapol NX	9.2	4.7	4.0	2.5
PMU 5% uitvloeiers ethomeen S25 + lissapol NX	26	16	13	10
PMU + 5% experimentele uitvloeier	42.5	22	15	8
Ethomeen S25	2.5	1.6	1.3	1
Experimentele uitvloeier	22	10.2	6.5	3.3

Tabel 34 : TL₅₀⁶⁻⁹⁶-waarden van 4 gramoxoneformuleringen en twee uitvloeiers bij Salmo trutta (naar CARTER & WILLIAMS, 1968).

Deze resultaten zijn vrij analoog met deze die wij bekwamen met Brachydanio rerio. Onthouden wij hieruit vooral dat het effect van een mengsel van produkten wel afhankelijk is van het effect van elk van de componenten, doch er niet eenduidig uit af te leiden is. Bovendien illustreren de re-

sultaten met paraquat met respektievelijk 10% en 5% van dezelfde uitvloeiers dat het effect van het mengsel niet recht evenredig stijgt met de concentratie van de componenten. In Hoofdstuk 6 worden de interacties tussen paraquat en de toegevoegde detergenten uitvoerig bestudeerd.

Het herbicide 2,4-D is vrij onschadelijk voor de twee gebruikte testsoorten. Zoals bij paraquat is er bij 2,4-D echter een groot verschil wat betreft de toxiciteit op vis naargelang de formulering van het herbicide (in 4.2.1. werden de verschillende formuleringen opgesomd).

De minst toxische formuleringen van 2,4-D zijn de aminezouten (zoals het produkt dat wij gebruikten) en de Na-zouten (HUGHES & DAVIS, 1963). Deze produkten worden in water zeer snel tot het vrije zuur gehydrolyseerd en hun toxiciteit kan vergeleken worden met deze van het vrije zuur, dat van alle formuleringen het meest onschadelijk is.

In Tabel 35 werden de TL_{50} -waarden voor enkele andere vissoorten verzameld :

<u>2,4-D vrij zuur</u>	<u>TL₅₀ (ppm)</u>					<u>Auteur</u>
	<u>uur</u>	<u>24</u>	<u>48</u>	<u>72</u>	<u>96</u>	
Fathead minnow (<u>Pimephales promelas</u>)					500 geen effect	MOUNT & STEPHAN
Coho zalm (<u>Oncorhynchus kisutch</u>)					39	MEEHAN et al. (1974)
<u>2,4-D Na-zout</u>						
Bluegill (<u>Lepomis macrochirus</u>)					64	WALKER (1964)
Snoek (<u>Esox lucius</u>)		29	10			PRAVDA (1973)
Karper (<u>Cyprinus carpio</u>)		120	63			PRAVDA (1973)
Elrits (<u>Phoxinus phoxinus</u>)		120	76			PRAVDA (1973)
Baars (<u>Perca fluviatilis</u>)		10	10			PRAVDA (1973)

<u>2,4-D alkanolamine zout</u>					Auteur
TL ₅₀ (ppm)					
uur	24	48	72	96	
Fathead minnow (<u>Pimephales promelas</u>)				900	COPE et al., 1970
<u>2,4-D triethanolamine zout</u>					
Regenboogforel (<u>Salmo gairdneri</u>)		210			ALABASTER, 1969
<u>2,4-D dimethylamine zout</u>					
Bluegill (<u>Lepomis macrochirus</u>)		188			HUGHES & DAVIS, 1964

Tabel 35 : TL₅₀²⁴⁻⁹⁶-waarden van vijf 2,4-D-formuleringen bij verschillende vissoorten.

De resultaten zijn nogal uiteenliggend. Algemeen gesproken kan men wel stellen dat Pimephales promelas ("Fathead minnow") zeer weinig gevoelig is voor 2,4-D en anderzijds Esox lucius (snoek) en vnl. Perca fluviatilis (baars) biezonder gevoelig zijn voor 2,4-D. De resultaten voor Brachydanio rerio en Poecilia reticulata liggen tussen beide extremen in.

Vissen van zelfde afmetingen reageren meestal op eenzelfde manier op bepaalde concentraties van één bepaalde formulering van 2,4-D (MEEHAN et al., 1974).

De relatie tussen de grootte van de vis en het toxisch effect van een bepaald produkt werd beklemtoond door de experimenten van POST & SCHROEDER (1971) die vonden dat verschillende pesticiden toxischer zijn voor vissen met een klein lichaamsgewicht dan met een groot.

Dit gaat niet op voor 2,4-D met de twee gebruikte testsoorten. Brachydanio rerio weegt gemiddeld 0.2574 g en Poecilia reticulata 0.0399 g (zie 7.4.3.). B. rerio weegt dus 6.45 maal meer dan P. reticulata, maar is ongeveer 3.5 maal gevoeliger dan deze laatste soort.

Uit deze bespreking kunnen we volgende punten samenvatten :

- 1) De rangorde in toxiciteit van de uitgeteste produkten is voor beide vissoorten gelijk : diquat en paraquat zijn vrij toxisch, 2,4-D is praktisch onschadelijk ; de belangrijkste toxiciteit werd waargenomen met beide detergenten.
- 2) Het grootste effect van de produkten werd reeds in de eerste 24 uur van de proeven waargenomen, met uitzondering voor diquat waar de toxiciteit evenredig blijft stijgen met de tijd.
- 3) Het effect van paraquat op de adulte vissen werd zeer sterk vergroot door het toevoegen van de uitvloeiers lissapol NX en ethomeen S25.

5.5.5. Resultaten van de bioassays op eieren en larven van B. rerio

De TL_{50} -waarden voor de eieren en de larven worden in Tabel 36 weergegeven.

Eieren : TL₅₀ (24 u - 48 - 72) in ppm

	<u>24 u</u>	<u>48 u</u>	<u>72 u</u>
2,4-D	180	157	127
PMU	11.9	7.5	7.5
PZU	>32	27.4	26.1
diquat	370	135	36
lissapol NX	13.6	1.36	1
ethomeen S25	11.5	1.3	0.1

Larven : TL₅₀ (24 u - 48 u - 72 u - 96 u) in ppm

A. Eieren geïnkubeerd in het herbicide of detergent

	<u>24 u</u>	<u>48 u</u>	<u>72 u</u>	<u>96 u</u>
2,4-D	113	108	100	92
PMU	10.3	9.2	8.3	7.4
PZU	21.2	18.6	15.8	13.2
diquat	65	24	10	10
lissapol NX	-	-	-	<0.1
ethomeen S25	-	-	-	±1

B. Eieren geïnkubeerd in artificieel zoetwater en larven onmiddellijk na het ontluiken overgebracht in herbiciden of detergent

2,4-D	140	119	115	114
PMU	20	15.5	14	13
PZU	29	19	17.5	16.5
diquat	32.5	12.5	9	7.5
lissapol NX	5.7	3.2	>1	>1
ethomeen S25	3.2	3.2	>1	>1

Tabel 36 : TL₅₀²⁴⁻⁹⁶-waarden met eieren en larven van B. rerio.

5.5.6. Bespreking van de resultaten

In Tabel 37 wordt de rangorde in toxiciteit van hoog naar laag weergegeven voor de verschillende uitgevoerde proeven.

Eieren

ED₅₀ ^{24 u}

ethomeen S25 > PMU > lissapol NX > PZU >> 2,4-D > diquat

48 u

ethomeen S25 > lissapol NX > PMU > PZU >> diquat > 2,4-D

72 u

ethomeen S25 > lissapol NX > PMU > PZU > diquat > 2,4-D

Larven B (eieren geïnkubeerd in blanco)

ED₅₀ ^{24 u}

ethomeen S25 > lissapol NX > PMU > PZU > diquat > 2,4-D

48 u

ethomeen S25 = lissapol NX > diquat > PMU > PZU > 2,4-D

72 u

(ethomeen S25 = lissapol NX) > diquat > PMU > PZU > 2,4-D

96 u

(ethomeen S25 = lissapol NX) > diquat > PMU > PZU > 2,4-D

Harven H (eieren geïnkubeerd in herbicide)

ED₅₀ ^{24 u}

(ethomeen S25 = lissapol NX) > PMU > PZU > diquat > 2,4-D

48 u

(ethomeen S25 = lissapol NX) > PMU > PZU > diquat > 2,4-D

72 u

(ethomeen S25 = lissapol NX) > PMU > diquat > PZU > 2,4-D

96 u

lissapol NX > ethomeen S25 > PMU > diquat > PZU > 2,4-D

Tabel 37 : Rangorde in toxiciteit (van hoog naar laag) voor
B. rerio-eieren en -larven.

A. Uit de resultaten van de proeven met eieren kunnen we volgende punten afleiden :

1) De gevoeligheid van de eieren neemt na 48 uur inkubatie sterk toe. Dit is zeer duidelijk met de detergenten lissapol NX en ethomeen S25.

2) Met diquat vermeerderd de gevoeligheid na 48 uur t.o.v. deze na 24 uur met een faktor 2.75 ; na 72 uur stijgt ze nogmaals met een faktor 3.75 t.o.v. de waarde na 48 uur. Het effect van diquat en 2,4-D heeft dus een zekere traagheid in vergelijking met de andere produkten en is misschien na 72 uur nog niet maximaal. In de toxiciteitsrangorde schuift diquat op van de laatste plaats naar de voorlaatste plaats i.f.v. de tijd.

3) Voor de viseieren zijn de twee uitvloeiers het meest toxisch. Hun effect is goed vergelijkbaar, met uitzondering van de TL_{50} -waarden na 72 uur. Dan zijn de eieren 10 maal meer gevoelig voor ethomeen S25 dan voor lissapol NX.

4) PMU is steeds \pm 3.50 maal toxischer dan PZU. Behalve het mogelijk synergisme dat reeds herhaalde malen werd aangehaald, en wordt besproken in Hoofdstuk 6, kan het verschil in toxiciteit tussen beide paraquat-formuleringen ook te wijten zijn aan de belangrijke individuele toxiciteit van beide uitvloeiers.

B. Uit de resultaten van de proeven met larven konkluderen we het volgende :

1) Het inkuberen van de eieren in de testoplossing had slechts een geringe invloed op de gevoeligheid van de larven voor deze produkten. De larven, ontloken in de testoplossing, waren iets gevoeliger dan deze ontloken in artificieel zoetwater. De grootste verschillen zijn op te merken met PMU en met diquat in de eerste 48 uur.

2) De gevoeligheid van de larven stijgt regelmatig in functie van de tijd. Opnieuw worden de grootste verschillen vastgesteld bij diquat. Dat kan er op wijzen dat het traagheids-effect dat werd waargenomen in de proeven met viseieren en nu in de proeven met vislarven wordt teruggevonden, niet zozeer verband houdt met de permeabiliteit voor diquat van de eischaal, doch eerder een verschijnsel is dat kenmerkend is voor het werkingsmechanisme van diquat. Argumenten voor deze stelling vin-

den wij ook in de resultaten van de toxiciteitsproeven met adulte vissen, en met de crustaceën (zie 5.5.4. en 5.4.1.5.).

3) Voor de twee detergenten beschikken we slechts over fragmentaire gegevens omdat de TL_{50} -waarden niet steeds konden bepaald bij gebrek aan cijfermateriaal. Daar waar de TL_{50} -waarden wel konden berekend worden, blijken de detergenten steeds toxischer te zijn dan de herbiciden. Uit de proeven met larven van eieren geïnkubeerd in blanko-medium blijkt dat in de eerste 48 uur de twee uitvloeiers ongeveer een zelfde effect hebben. Men kan verwachten dat dit ook na 72 u en 96 u nog het geval is omdat voor beide detergenten de TL_{50}^{72-96} -waarden begrepen zijn tussen 3.2 en 1 ppm. De resultaten van de proeven met larven van eieren geïnkubeerd in de testoplossing zijn onvolledig. Toch is het belangrijk op te merken dat na 96 u lissapol NX toxischer is dan ethomeen S25. Dit resultaat is een uitzondering op de bevindingen van alle andere toxiciteitsproeven die wij uitvoerden. Daarin was het effect van ethomeen S25 namelijk steeds groter dan van lissapol NX.

4) Het verschil in toxiciteit van PMU t.o.v. PZU is klein voor de larven uitgeslopen uit eieren geïnkubeerd in artificieel zoetwater. Voor de larven van eieren geïnkubeerd in de testoplossing is het effect van PMU 2 maal groter dan van PZU. Uit de TL_{50}^{96} -waarden kunnen we afleiden dat laatstgenoemde serie larven ook gevoeliger is voor de uitvloeiers afzonderlijk dan de eerste serie, terwijl het herbicide paraquat in beide series ongeveer eenzelfde effect heeft.

Daaruit zou men kunnen afleiden dat de individuele toxiciteit van de detergenten, de toxiciteit van het mengsel bepalen. Toch mogen we het synergistisch effect van de uitvloeiers met het herbicide niet verwaarlozen : vermits de eieren zeer gevoelig zijn voor de uitvloeiers kan men verwachten dat een inkubatie van de eieren in subletale concentraties PMU voor gevolg heeft dat de uitvloeiers in PMU aanwezig, de permeabiliteit van de membranen waarlangs het paraquat wordt opgenomen tijdens het embryonaal stadium reeds dermate veranderen dat het effect van PMU op de larven groter wordt dan het effect van PZU.

C. Uit de resultaten van onze proeven met B. rerio-eieren en -larven volgt dat de eieren van deze vissoort veel minder gevoelig zijn voor 2,4-D, PZU en diquat dan zijn larven ; daarentegen blijken de eieren vanaf 48 uur gevoeliger te zijn dan de larven voor PMU en de twee detergenten. Algemeen wordt aangenomen dat vislarven gevoeliger voor toxikanten zijn dan bevruchte eieren (HILTIBRAN, 1967). Zo zijn Brachydanio-larven bijvoorbeeld gevoeliger voor Aflatoxin B_I dan de embryos omdat deze stof verlamming van de staart veroorzaakt en dit voor embryos tot het ontluiken geen vitale functie is (ABEDI & MCKINLEY, 1968). In zijn experimenten met zinksulfaat vond SKIDMORE (1966) daarentegen dat het membraan rond het embryo van Brachydanio rerio i.p.v. de embryos beschermen eerder het effect van het zinksulfaat vermeerderde. Door het eimembraan door te breken in om het even welk stadium van de ontwikkeling, leefden de embryos gemiddeld 10 uur langer dan de embryos in intakte membranen. Het is dus duidelijk dat elk toxikans een specifiek werkingsmechanisme heeft en bijgevolg een specifieke reactie met het eimembraan, met het embryo of met de larven kan veroorzaken, waardoor het onmogelijk wordt een algemene regel voorop te stellen waaruit zou blijken dat één of ander stadium gevoeliger is dan het andere. Voor eenzelfde stadium hebben verschillende produkten de meest uiteenlopende effecten : Zo zijn zinksulfaat en het organofosforpesticide, cygon, in vergelijking met de herbiciden en detergenten die wij uittesten, relatief weinig toxisch voor Brachydanio rerio-eieren (ROALES & PERLMUTTER, 1974) :

	TL ₅₀ ppm (+ SE)		
	24 u	48 u	72 u
zink	6714 ± 570	136 ± 18.5	19 ± 2.2
cygon	----	940 ± 13.2	259 ± 10.9

Anderzijds zijn Brachydanio rerio-larven zeer gevoelig voor de fungiciden folpet, difolatan en captan (respektievelijk TL₅₀^{35 min} = 0.71 ; TL₅₀^{40 min} : 0.21 ; TL₅₀^{40 min} = 0.65 ppm) .

(ABEDI & TURTON, 1968). Deze auteurs konkludeerden tevens dat er geen korrelatie bestond tussen de werkingssnelheid van de componenten en hun relatieve toxiciteit. Wij kwamen reeds tot dit besluit, in verband met de relatieve traagheid waarmee het effect van diquat op B. rerio-eieren en -larven optrad.

In een reeks van proeven met 15 herbiciden (waaronder diquat en 2,4-D) met larven van 4 verschillende vissoorten, toonde HILTIBRAN (op.cit.) aan dat diquat een hogere toxiciteit heeft voor al deze larven dan voor jonge "bluegills" (Lepomis macrochirus) van 2.5 tot 7.5 cm. Het 2,4-D is zowel voor de larven als voor de jonge visjes zeer schadelijk. De auteur kon aan de hand van zijn experimenten evenwel niet vaststellen welk van de beide stadia het gevoeligst was voor dit herbicide.

Karpereieren en -larven (Cyprinus carpio) vertonen slechts een geringe mortaliteit na 48 ppm inkubatie in 3200 ppm 2,4-D-Na-zout (KAMLER et al., 1974). Zalmlarven daarentegen zijn zeer gevoelig voor 2,4-D (MEEHAM et al., 1974). De TL_{50}^{96} -waarden voor de larven van verschillende zalmsoorten bedragen : Onco-rhynchus gorboscha 10.7 ppm, O. keta 42 ppm en O. kisutch 37 ppm, vrij 2,4-D-zuur.

McKIM et al. (1975) menen dat de larvale stadia van vissen de meest gevoelige organismen zijn voor een lineair alkyl sulfo-naat detergent (LAS) en stellen bijgevolg dat alleen bioassays met vislarven van nut kunnen zijn voor het bepalen van een voor vissen aanvaardbare dosis LAS in het water.

In zijn review wees ABEL (1974) er reeds op dat vissen en specifieke vislarven extreem gevoelig zijn voor detergenten en voornamelijk voor anionische tensioactieven, waartoe het lineair alkylsulfonaat behoort.

Uit onze experimenten blijkt bovendien dat ook het non-ionische lissapol NX en het kationische ethomeen S25 zeer toxisch zijn voor de bevruchte eieren en de larven van Brachydanio rerio.

Konkluderend kunnen we zeggen dat :

- 1) detergenten biezonder toxisch zijn voor de embryonale en larvale stadia van Brachydanio rerio.
- 2) het effect van diquat slechts met een zekere traagheid optreedt zowel op B. rerio-eieren als op de larven, zodat dit verschijnsel niet toe te schrijven is aan permeabiliteits-

veranderingen van het eimembraan voor dit produkt.

- 3) het toevoegen van detergenten aan paraquat de toxiciteit van dit mengsel steeds verhoogt. Deze verhoging is echter niet gelijk in de serie met B. rerio-eieren en de twee series met B. rerio-larven. Dit verschil is ten eerste te wijten aan de verschillende individuele toxiciteit van de produkten in elk van de drie series, en ten tweede aan de interakties tussen de componenten van het mengsel voor wat betreft het toxisch effect op de eieren en de larven. Eén van de mogelijke synergismen is het verhogen door de detergenten van de permeabiliteit van de membranen waarlangs het paraquat wordt opgenomen.
- 4) het herbicide 2,4-D (gebruikt als het triethanomaminezout) vrij onschadelijk is zowel voor B. rerio-eieren als voor de larven.

5.6. Samenvatting van de resultaten omtrent de toxiciteit van de herbiciden paraquat, diquat en 2,4-D en van de uitvloeiers lissapol NX en ethomeen S25 op de onderzochte vertegenwoordigers van het aquatisch ecosysteem

De resultaten van de verschillende bioassays zijn samengevat in Tabel 38.

5.6.1. Paraquat

De gegevens uit de literatuur tonen duidelijk aan dat de kwaternaire ammoniumderivaten, waaronder paraquat en diquat, in vergelijking met andere herbiciden sterke algicide eigenschappen voor zoetwaterwieren hebben (SCHLUTER, 1966 ; MALONEY & PALMER, 1956 ; THOMAS et al., 1973). Volgens de resultaten van WALSH (1972) zou paraquat anderzijds een veel minder efficiënt algicide zijn voor mariene eencellige wieren.

Uit onze proeven blijkt dat van de 3 uitgeteste herbiciden paraquat het meest toxische is voor de mikroalgen Scenedesmus opoliensis en Chlamydomonas reinhardi. C. reinhardi blijkt ongeveer 3 maal gevoeliger voor dit produkt dan S. opoliensis.

Voor beide wiersoorten is de formulering van paraquat met uitvloeiers minder toxisch dan de formulering van paraquat zonder uitvloeiers. Dit is juist het tegenovergestelde van het effect bij hogere planten waar de formulering met uitvloeiers steeds efficiënter is dan de formulering zonder detergenten (STRYCKERS, 1970).

Gezien het belang van dit probleem voor de praktijk hebben wij een afzonderlijke studie gewijd aan de invloed van de additieven lissapol NX en ethomeen S25 op de toxiciteit van paraquat (zie Hoofdstuk 6).

Wat het toxiciteitsonderzoek op crustaceën betreft, wijzen onze resultaten zoals deze van CROSBY & TUCKER (1966) op een zeer grote gevoeligheid van de crustaceën t.o.v. paraquat. Artemia salina maakt hierop echter een uitzondering. Bij de daphniden bedragen de TL_{50} -waarden slechts enkele ppm. In vergelijking met literatuurgegevens zijn dit zeer lage waarden. Tussen de twee Daphnia-soorten bestaat er een belangrijk verschil in gevoeligheid : Daphnia pulex is 1.5 à 2 maal gevoeliger dan D. magna. Dit werd reeds eerder voor andere producten vastgesteld (KOCHLER et al., 1953 ; SANDERS & COPE, 1966). Voor beide soorten zijn de larvele stadia veel gevoeliger voor paraquat dan de adulten. Ook dit werd met andere producten reeds vastgesteld o.a. door ANDERSON (1950), SANDERS & COPE (1966), SANDERS (1970).

De proeven met D. magna-larven en A. salina-larven, in parallel met en zonder luchtdoorborreling, tonen aan dat een verhoogde opgeloste O_2 -concentratie in het milieu ook de toxiciteit van paraquat verhoogt. Dit zou er op wijzen dat het werkingsmechanisme van paraquat, bestaande uit een reductie tot het vrij radikaal gevolgd door een auto-oxidatie in aanwezigheid van moleculaire zuurstof, behalve bij planten en hogere dieren (zie 4.1.2. en 4.1.5.), ook opgaat voor alle aerobe organismen die een cytochroomsysteem bezitten, en aldus elektronen kunnen leveren voor de reductie van het paraquat kation. In alle aerobe organismen met een cytochroomsysteem werden immers katalase en superoxide dismutase teruggevonden (McCORD, KEELE & FRIDOVICH, 1971). Deze enzymen breken res-

pektievelijk de peroxiden en superoxiden af. Het is dus duidelijk dat indien zelfs in natuurlijke omstandigheden de moleculaire zuurstof omgezet wordt tot het peroxide en het superoxide radikaal, dit meer dan waarschijnlijk ook het geval zal zijn bij een paraquat-intoxikatie, zoals reeds werd bewezen voor hogere planten en zoogdieren.

Het toedienen van voedsel aan de Daphnia en Artemia-larven beïnvloedt de toxiciteit van paraquat omzeggens niet. Dit is echter ook met andere produkten niet het geval, wat er op wijst dat het verschijnsel kenmerkend is voor de larven gevoed met een bepaald voedsel, eerder dan een typisch kenmerk voor bv. paraquat. In elk geval mag men besluiten dat er geen verhoogde intoxicatie optreedt via de voedselbaan.

De TL_{50} -waarden voor de larven van de modderkrab Rhithropanopeus harrisii zijn uitzonderlijk laag. Bij een concentratie van minder dan 1 ppb PZU wordt reeds de helft van de larven gedood. Geen wonder dat de decapoden-larven in de literatuur bekend staan als zeer gevoelige organismen (RAWLS, 1965 ; BOOKHOUT et al., 1972).

Toch zijn de TL_{50} -waarden voor PMU en PZU die wij terugvonden de laagste TL_{50} -waarden ooit gevonden voor paraquat. Tot nu toe was de laagste waarde deze vastgesteld bij de adulte amphipode Hyaella azetica. De TL_{50}^{96} bedraagt 48 ppb (WILSON & BOND, 1969). In veldonderzoek werd eveneens opgemerkt dat amphipoden biezonder gevoelig zijn voor dit herbicide (BURNET, 1972).

Voor de Daphnia's en voor Artemia wordt de toxiciteit van paraquat weinig of niet beïnvloed door het toevoegen van detergenten aan de formulering. Voor Rhithropanopeus daarentegen daalt de mortaliteit van de krablarven door het toevoegen van uitvloeiers met een faktor 5. Ook verkleint het vertragend effect op de larvale ontwikkeling van paraquat. Zoals voor beide wiersoorten zijn deze resultaten tegenovergesteld aan deze bekomen met terrestrische planten. Een verdere bespreking hiervan aangevuld door nieuwe experimenten vindt men in Hoofdstuk 6.

De vissen Brachydanio rerio en Poecilia reticulata zijn in vergelijking met literatuurgegevens middelmatig gevoelig voor paraquat. P. reticulata is 2 maal gevoeliger voor PMU en PZU dan B. rerio. Het wordt als een algemene regel aangenomen dat de bevruchte eieren en de larven van vissen gevoeliger zijn voor toxikanten dan de adulte vissen (HILTI-BRAN, 1967). De embryonale en voornamelijk de larvale stadia van B. rerio worden zeer sterk aangetast door PZU. Met PMU zijn de eieren en de adulten het gevoeligst omdat deze stadia tevens het gevoeligst zijn voor de uitvloeiers afzonderlijk.

De twee uitvloeiers zijn extreem toxisch voor vissen en de combinatie met paraquat verhoogt de toxiciteit van dit produkt aanzienlijk, zowel voor de eieren, de larven als de adulten. We verwijzen hieromtrent opnieuw naar Hoofdstuk 6 voor verdere informatie.

	ALGAE				CILIATA		CRUSTACEA						PISCES				
	<u>Scenedesmus opoliensis</u>		<u>Chlamydomonas reinhardi</u>		<u>Stylonychia mytilus</u>		<u>Daphnia magna</u>			<u>Daphnia pulex</u>		<u>Artemia salina</u>	<u>Rhithropanopeus harrisii</u>	<u>Brachydanio rerio</u>			<u>Poecilia reticulata</u>
	120 u		120 u		72 u												
	integraal	eindconcentratie	integraal	eindconcentratie	<u>Scenedesmus</u> gevoed	gist gevoed	larven 48 u	adulten 48 u	adulten 3 weken	larven 48 u	adulten 48 u	larven 48 u	larven larvale ontwikkeling	eieren 72 u	larven 96 u	adulten 96 u	adulten 96 u
Paraquat (ion) zonder uitvloeiers (PZU)	0.33	0.27	0.10	0.09			2.8	3.7		1.3	2.4	72	0.00086	26.1	16.5	48.5	22
Paraquat (ion) met uitvloeiers (PMU)	0.40	0.37	0.14	0.13			1.8	3.2		1.0	2.7	73	0.0046	7.5	13	7.5	15
Diquat (ion)	0.52	0.52	0.12	0.11			0.61	3.0		0.33	0.42	24	0.00082	36	7.5	23.5	18
2,4-D	800	715	305	412	181	118	105	158	21	6.6	26	320	0.1	36	114	160	520
Lissapol NX	37.5	35.5	30.3	22.3			12	17		4.8	8.5	-	1.24	1	-	5	12.5
Ethomeen S25	1.33	1.53	1.1	1.0			4.3	11.5		3.7	4.2	-	0.13	0.1	-	2.3	2.4

Tabel 38 : Samenvattende tabel met de TL₅₀-waarden van PZU, PMU, diquat, 2,4-D, lissapol NX en ethomeen S25 met alle testorganismen (alleen de TL₅₀-waarden met de langste testduur werden opgenomen).

5.6.2. Diquat

De algicide en de toxische eigenschappen van diquat in het algemeen zijn zeer analoog aan deze van paraquat. Diquat is iets minder toxisch voor de wieren dan paraquat. Dit stemt overeen met de gegevens van THOMAS et al. (1973) en WALSH (1972). Chlamydomonas reinhardi is 4.5x gevoeliger voor diquat dan Scenedesmus opoliensis.

Het werkingsmechanisme van diquat berust zoals met paraquat, op het ontstaan van het superoxide radikaal uit moleculaire zuurstof ten gevolge van een auto-oxidatie van het diquat-radikaal (zie 4.1.2. en 4.1.5.). VAN RENSEN (1975) leverde het bewijs dat dit mechanisme opgaat voor Scenedesmus sp., door het superoxide-radikaal en de lipidenperoxidatie in de cellen aan te tonen.

Alle onderzochte crustaceën worden meer door diquat dan door paraquat aangetast.

Daphnia pulex is meer gevoelig voor diquat dan Daphnia magna en de larven zijn minder resistent dan de adulten. In de paragraaf over paraquat werd hierop reeds de aandacht gevestigd.

De proeven met Daphnia- en Artemia-larven, in parallel met en zonder luchtdoorborreling, leiden tot dezelfde konklusie als in het geval van paraquat. Met diquat beschikken we bovendien over de bewijzen geleverd door VAN RENSEN (op.cit.) om aan te nemen dat het werkingsmechanisme van de dipyridyliums algemeen is voor de verschillende stappen van een aeroob aquatisch en terrestrisch ecosysteem (inklusief de mens).

De vissen Poecilia reticulata en Brachydanio rerio zijn meer gevoelig voor diquat dan voor PZU maar minder dan voor PMU. P. reticulata is iets meer gevoelig dan B. rerio. Brachydanio-eieren zijn in vergelijking met de andere stadia en met P. reticulata zeer goed beschermd tegen diquat ; de larven zijn daarentegen biezonder gevoelig.

Algemeen valt het op dat de toxiciteit van diquat nog sterk verandert in functie van de tijd, terwijl voor de andere produkten reeds na 24 u een vrij stabiele toestand is bereikt. Dit is het duidelijkst in de proeven met beide vissoorten als dusdanig, zowel als met de eieren en larven van B. rerio ; het komt eveneens tot uiting bij beide Daphnia-soorten en Artemia salina.

Deze traagheid van het effect van diquat voor zeer verscheidene organismen kan niet uitsluitend te wijten zijn aan de snelheid waarmee het diquat door de organismen wordt geabsorbeerd. De absorptie van paraquat en diquat is wellicht voor elk organisme verschillend. Men kan echter veronderstellen dat het langer uitblijven van het effect van diquat t.o.v. paraquat kenmerkend is voor het werkingsmechanisme van diquat. Deze hypotese dient nog verder te worden onderzocht.

5.6.3. 2,4-D (triethanolaminezout)

2,4-D is voor alle testspecies steeds het minst toxisch produkt uit de reeks, met uitzondering van het geval van Rhithropanopeus-larven, waarbij de 2 uitgeteste detergenten het minst toxisch zijn.

2,4-D is een weinig efficiënt algicide voor beide zoetwaterwieren Scenedesmus opoliensis en Chlamydomonas reinhardi. Bij enkele andere eencellige zoetwater groenwieren (VOIGHT & LYNCH, 1974) en bij sommige zoutwaterwieren (WALSH, 1972) is dit produkt daarentegen veel doeltreffender. Er valt op te merken dat 2,4-D de populatiegroei van C. reinhardi niet gelijkmatig met verloop van tijd remt : de relatieve groei-konstante tijdens de exponentiële groei is even groot en soms zelfs groter in de testopstellingen met 2,4-D als in de blanco-opstellingen, doch de aanlopfaze van de wierpopulatie wordt verlengd.

De hypotriche zoetwaterciliaat Stylonychia mytilus is eveneens vrij resistent tegen 2,4-D ; meer resistent zelfs dan de Crustacea, met uitzondering van Artemia salina. Voor S. mytilus speelt de aard van het toegediende voedsel een be-

langrijke rol in de toxiciteit van 2,4-D (fysiologische konditie van de testspecies, of adsorptie aan voedselpartikels?).

Daphnia pulex-adulten zijn 5 à 10x gevoeliger dan D. magna-adulten. D. pulex-larven t.o.v. D. magna-larven 15x. De cladoceren zijn in vergelijking met de andere testspecies vrij gevoelig voor 2,4-D.

De resultaten van de chronische testen (3 weken) met D. magna tonen enerzijds aan dat de gevoeligheid rechtlijnig stijgt bij exponentiële toenamen van de testduur, en anderzijds dat de reproductie van D. magna door lage 2,4-D concentraties (1.25 ppm) reeds sterk wordt geremd. Rhithropanopeus-larven zijn ook voor 2,4-D zeer gevoelig. De TL_{50} bedraagt 100 ppb. Deze waarde is echter nog 200x groter dan de TL_{50} -waarde van PZU. Bovendien heeft dit produkt een uitzonderlijke invloed op de ontwikkelingsduur van de larven. Vanaf een concentratie van 10 ppb wordt de larvale ontwikkeling van R. harrisii megalopa-larven versneld (bij 100 ppb statistisch significant).

Uit een aantal analoge gegevens in verband met de larvale ontwikkeling van "bluegill"-larven (COPE et al., 1970) en van kuikens (SOMERS et al., 1974), kan men de hypothese vooropstellen dat de groei-regulerende werking van 2,4-D behalve voor plantaardig materiaal, ook geldt voor dierlijke organismen. In dit geval spelen zowel de toegediende dosis als het ontwikkelingsstadium en het geslacht van de testorganismen een belangrijke rol.

De vis Poecilia reticulata is bijzonder resistent tegen 2,4-D. De TL_{50}^{90} -waarden voor Brachydanio rerio (adulten, eieren, larven) zijn lager maar bedragen toch meer dan 100 ppm. Andere zoetwatervissen als snoek en baars zijn daarentegen zeer gevoelig voor 2,4-D (vrij zuur) (TL_{50}^{48} voor beide soorten 10 ppm) (PRAVDA, 1973).

Ook zalmlarven worden gedood door concentraties tussen de 10-40 ppm 2,4-D (MEEHAM et al., 1974).

5.6.4. De uitvloeiers : ethomeen S25 en lissapol NX

De uitvloeiers op zichzelf zijn niet onschadelijk voor wiercellen. Een dosis van 1 ppm ethomeen S25 vermindert de groei van Scenedesmus opoliensis en Chlamydomonas reinhardi met + 50%. Lissapol NX is 30x inaktiever.

De crustaceeën zijn minder gevoelig voor de detergenten dan voor de herbiciden, met uitzondering van 2,4-D. Voor beide Daphnia-soorten veroorzaken 10 ppm detergent ongeveer 50% mortaliteit ; ethomeen S25 is hierbij iets toxischer dan lissapol NX.

Het megalopa-stadium van Rhithropanopeus harrisii is, in tegenstelling met de zoea-stadia, gevoeliger voor de detergenten dan voor de herbiciden ; ethomeen S25 in het bijzonder verhoogt de mortaliteit van de krablarven in dit stadium en vertraagt tevens de overgang naar het 1ste krab-stadium op significante wijze.

Beide uitgeteste vissoorten en voornamelijk de bevruchte eieren en de larven zijn extreem gevoelig voor beide uitvloeiers.

McKIM et al. (1975) menen dat de larvale stadia van vissen de meest gevoelige organismen zijn voor anionische detergenten

Uit onze proeven blijkt echter duidelijk dat ook het kationische ethomeen S25 en het non-ionische lissapol NX zeer toxisch zijn voor Brachydanio rerio en Poecilia reticulata. Vermits deze twee detergenten niet doelbewust in een aquatisch ecosysteem worden aangewend, zijn er ook geen toepassingsnormen voorzien. Onze interesse voor deze produkten is te wijten aan het feit dat zij worden aangewend als additieven in de commerciële formulering van paraquat met uitvloeiers.

Voor de interactie die er bestaat tussen deze detergenten en het herbicide paraquat verwijzen we naar Hoofdstuk 6.

6. INVLOED VAN TENSIOAKTIEVE STOFFEN OP DE FYTOTOXICITEIT EN DE ALGEMENE TOXICITEIT VAN HET HERBICIDE PARAQUAT

6.1. Inleiding

Tensio-aktieve stoffen zijn één van de belangrijkste hulpmiddelen bij het bereiden van de meest geschikte formuleringen voor het aanwenden van agrochemikaliën.

Vooral in de farmakologie is reeds veel bekend over de invloed van tensio-aktieven op de absorptie en de werking van bepaalde geneesmiddelen.

Zowel bij de aanwending van detergenten in mengsels op landbouwkundig gebied als op farmakologisch gebied kunnen de toegediende detergenten het effect van de actieve stof op de meest uiteenlopende wijze beïnvloeden, zowel in positieve als in negatieve zin. GIBALDI & FELDMAN (1970) beschrijven de effecten van tensio-aktieven als volgt :

"These effects include interaction with biologic membranes and modification of membrane permeability, interaction with the drug, interaction with the dosage form, and interaction with the organism itself resulting in a pharmacologic effect which may in turn influence drug absorption. These effects may be operative at the same time, some tending to enhance drug absorption, others tending to retard it, and the net effect dependent on the relative magnitude of each".

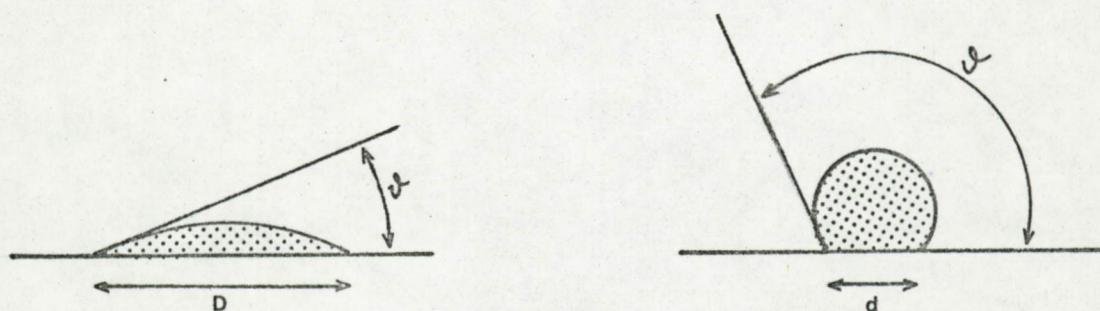
6.2. Eigenschappen van de detergenten, die een effect kunnen hebben op de toxiciteit van paraquat

In hoge concentraties van een waterige oplossing aggregeren de molekulen van een detergent en vormen zogenaamde micellen. De kritische concentratie waarin deze micellen worden gevormd noemt men de "critical micelle concentration" of CMC. Deze aggregaten hebben de eigenschap de oplosbaarheid in water van bepaalde minder oplosbare organische en anorganische producten sterk te verhogen door het vormen van zwak gebonden complexen.

Een andere belangrijke eigenschap van een tensio-actieve stof is het vergroten van het effectief kontaktoppervlak tussen het chemisch produkt en het weefsel waar het moet opgenomen worden.

De lipoïde eigenschappen van de vetachtige stoffen, waaruit de oppervlaktelagen van het blad (waslaag, cuticula) zijn samengesteld, werken de bevochtiging door water tegen. Door het toevoegen van detergenten aan de formulering van een wateroplosbaar herbicide, zoals paraquat, kan het effectief kontaktoppervlak met de hydrofobe plantendelen sterk worden verhoogd doordat de kontakthoek tussen de vloeistof en het vast materiaal sterk wordt verminderd. Vermindering van de kontakthoek laat een inniger contact tussen herbicide en weefsel toe, waardoor het effectoppervlak en de absorptiesnelheid wordt verhoogd.

Deze hoek wordt door STRYCKERS (1970) gedefinieerd als de hoek gevormd door de raaklijn aan de druppel spuitvloeistof en het kontaktoppervlak (D, d) hier het bladoppervlak (figuur 43).



Figuur 43 : Kontakthoek en kontaktoppervlak van een druppel spuitvloeistof (naar STRYCKERS, 1970).

In een waterig systeem is de invloed van detergenten op de werking van herbiciden veel komplexer. Het hydrofiel-lipofiel karakter van de detergenten is verantwoordelijk voor hun neiging tot concentreren aan oppervlakken. Behalve ter hoogte van het kontaktoppervlak tussen lucht en water,

koncentreren de detergentmolekulen zich ter hoogte van het oppervlak van alle substraten die in het milieu aanwezig zijn. Over de accumulatie van detergents ter hoogte van het lichaamsoppervlak van vissen schrijft ABEL (1974) :

"This is of unknown significance in the toxic action of detergents, but its possible importance is obvious from the consideration that any toxic substance must take contact with the fish in order to exert its effect".

In verband met het effect van detergents op vissen en crustaceën, moet, naast het effect veroorzaakt door het direkte kontakt van het produkt met het lichaamsoppervlak (inklusief het kieuwepiteel), ook rekening worden gehouden met het effect veroorzaakt door een opname van het detergent langs het spijsverteringsstelsel.

Tensio-aktieve stoffen en in het bijzonder polyoxyethyleenderivaten (waaronder ethomeen S25 en lissapol NX), kunnen het tempo waaraan de maaginhoud in de darm wordt geledigd en de snelheid van de intestinale transit, beïnvloeden door een fysische verandering van viskositeit van gastro-intestinale vochten (GIBALDI & FELDMAN, 1970). Bij Mammalia wordt de viskositeit van deze vochten verhoogd, waardoor de diffusie van een chemisch produkt doorheen de darminhoud wordt geremd en het debiet van de voedselstroom doorheen de darm wordt vermindert. Dit leidt dan tot een verminderde absorptie van het produkt in de lichaamsvochten (OKUDA et al., 1960 ; LEVY & JUSKO, 1965).

6.3. Opsporen van mogelijke interakties tussen paraquat en zijn uitvloeiers aan de hand van "faktoriële experimenten"

Met het oog op een beter inzicht in de interakties die er bestaan tussen paraquat en de twee detergents die in de formulering "gramoxone" aan het paraquat zijn toegevoegd werden twee experimenten gedaan van het "faktoriële type".

6.3.1. Metode

Er werd reeds lang aangetoond (FISCHER, 1935) dat men er alle voordeel bij heeft om de studie van diverse factoren te combineren in hetzelfde "factorieel experiment" waarin twee of meer factoren simultaan worden uitgetest. De methode die we gebruikten (SORGELOOS & BENIJTS-CLAUS, 1975) is een modifikatie van de methode DAVIES (1954), en biedt de mogelijkheid, enerzijds, het effect op te sporen van het veranderen van één variabele, onafhankelijk van de andere variabele en anderzijds de interacties te achterhalen tussen de verschillende factoren.

Konkreet komt dit hierop neer dat na het uitkiezen van een reeks waarden voor iedere te bestuderen factor, men elke mogelijke combinatie van de levels van beide factoren, in één of meerdere parallellen uittest. De levels moeten steeds orthogonaal gekozen worden, d.w.z. met gelijke intervallen tussen de verschillende levels van eenzelfde factor (SNEDECOR & COCHRAN, 1967).

Met deze resultaten voert men eerst een variantie-analyse uit, m.a.w. men gaat de significantie na van het effect van iedere factor afzonderlijk en van alle mogelijke interacties. Elk effect wordt vervolgens aan de hand van een regressie-analyse, als een afzonderlijke term in de regressievergelijking opgenomen. Deze regressievergelijking is de getrouwe weergave van het factorieel experiment en laat toe door substitutie van de onafhankelijk veranderlijken (die staan voor de verschillende factoren) het verwachte resultaat te berekenen. Door deze resultaten uit te tekenen bekomt men de zogenaamde "yield contours". Deze diagramma's of isopleten zijn een projectie van het resultaten-oppervlak (3-dimensionaal) dat beantwoordt aan de regressievergelijking.

6.3.2. Materiaal

Een dergelijk factorieel experiment werd in 4 parallellen uitgevoerd met het groenwier Scenedesmus opoliensis en in 3 parallellen met de vis Poecilia reticulata. De methoden en de proefomstandigheden van deze bioassays waren dezelfde als deze beschreven respectievelijk in 5.2.4. en 5.5.2.1.

Voor Scenedesmus opoliensis werden de paraquatkoncentraties 0.1, 0.2, 0.3 en 0.4 ppm, gekombineerd met uitgetest 0, 25, 50 en 75% uitvloeiers (lissapol NX en ethomeen S25). De detergenten werden daarenboven in drie verschillende verhoudingen aan het paraquat toegediend, nl. 1:9, 1:1 en 9:1 ethomeen S25/lissapol NX, hetgeen uiteindelijk 48 combinaties betekent.

In het faktorieel experiment met Poecilia reticulata als testorganisme werden de paraquatkoncentraties 5, 10, 15 en 20 ppm uitgetest, terug in combinatie met 0, 25, 50 en 75% uitvloeiers in 3 verschillende verhoudingen, nl. 1:9, 1:1 en 9:1 ethomeen S25/lissapol NX.

6.3.3. Resultaten en bespreking

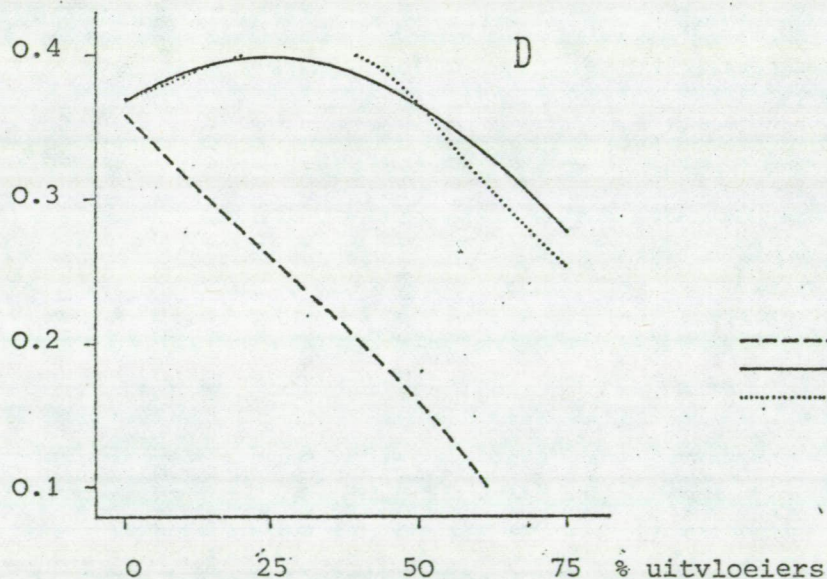
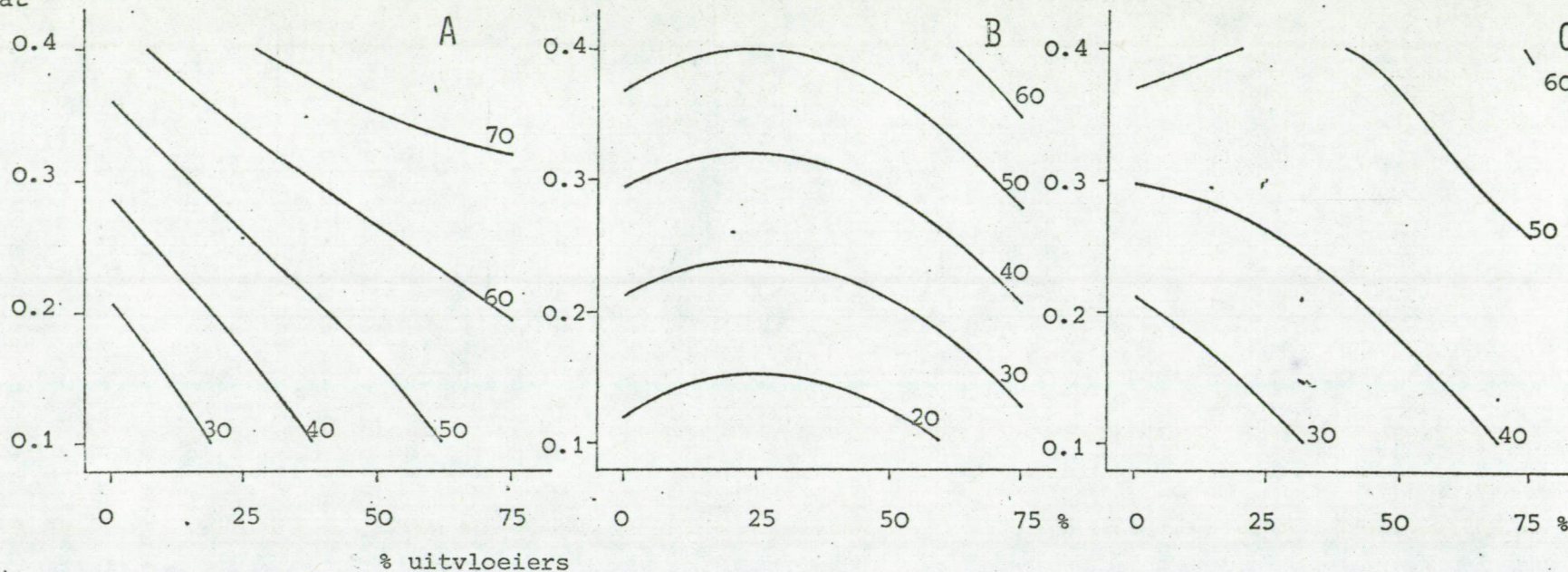
In Figuur 44 en 45 geven de isopleten het % effect weer in functie van de concentratie paraquat en het % uitvloeiers in 3 verhoudingen (voor 0% uitvloeiers is het effect voor de 3 verhoudingen uiteraard hetzelfde). De 50% effect-lijn geeft ED_{50} -waarden weer voor alle combinaties van paraquat en de uitvloeiers in 3 verschillende verhoudingen.

6.3.3.1. Scenedesmus opoliensis

In dit experiment valt het op dat door toevoeging van het mengsel met 1 deel ethomeen S25 en 9 delen lissapol NX de toxiciteit van paraquat sterk vergroot (Figuur 44A).

De isopleten zijn vrijwel rechtlijnig, d.w.z. dat de remming van de wierpopulatie zowel door paraquat als door het mengsel van uitvloeiers op lineaire wijze wordt bepaald : een lineaire stijging van de concentratie paraquat en een lineaire stijging van het procent uitvloeiers hebben een lineaire stijging van het effect voor gevolg. De 50% isopleet heeft een helling van ongeveer 45° . Dit duidt erop dat een lineaire stijging van de concentratie paraquat en van het percentage uitvloeiers een even groot effect hebben op de remming van de wierpopulatie. Voor een lage concentratie paraquat heeft de 30% lijn een helling van ongeveer 60° terwijl bij de hoge paraquatkoncentraties de 70% lijn een helling heeft van onge-

Paraquat
(ppm)



Figuur 44 : 'Procentuele inhibitie'-isoplethen van *Scenedesmus opoliensis* i.f.v. de concentratie paraquat en het percent toegevoegde uitvloeiers. De uitvloeiers ethomeen S25 en lissapol NX werden in 3 verhoudingen toegediend :

A : 1:9
B : 1:1
C : 9:1
D : 50 % inhibitieisoplethen van de 3 verhoudingen.

veer 30°. De invloed van het toevoegen van uitvloeiers is bijgevolg afhankelijk van de concentraties paraquat. Bij lage concentraties zal een kleine stijging van het % toegevoegde uitvloeiers, de remming van de wiergroei meer vergroten dan bij een kleine stijging van het % uitvloeiers bij hoge paraquatconcentraties. Bij lage concentraties paraquat domineert de toxiciteit van de detergenten, bij hoge concentraties paraquat, domineert de toxiciteit van paraquat.

De toevoeging van uitvloeiers wordt onmiddellijk waargenomen, m.a.w. er bestaat geen drempelwaarde voor de concentratie aan detergenten onder hetwelke het effect minder waarneembaar is.

Figuur 44B geeft de resultaten weer met een mengsel met 1:1 verhouding. Hieruit blijkt dat deze combinatie minder toxisch is dan de 1:9 ethomeen S25/lissapol NX verhouding : voor 100 ppb paraquat + 75% uitvloeiers in 1:1 verhouding wordt 20 à 30% remming van de wierpopulatie waargenomen, terwijl bij een 1:9 verhouding de remming voor eenzelfde combinatie reeds 50 à 60% bedraagt. Het is opvallend dat de horizontale richting in de isopleten domineert, m.a.w. dat het effect van paraquat op de populatieremming belangrijker is dan het effect van de uitvloeiers. Het is bovendien een merkwaardig fenomeen dat door toevoeging van 25% uitvloeiers in deze verhouding de toxiciteit van paraquat wordt verminderd i.p.v. vermeerderd.

Eenzelfde verschijnsel wordt waargenomen bij het mengsel met 9:1 ethomeen S25/lissapol NX verhouding (Figuur 44C), althans voor de 50% isopleet. Zelfs een additie van 50% uitvloeiers vermindert de ED_{50} -waarde van paraquat nog. Het feit dat de isopleten niet parallel verlopen is opnieuw een aanwijzing dat paraquat en de uitvloeiers niet onafhankelijk van elkaar reageren : vermindering van de toxiciteit van paraquat door toevoeging van detergenten gebeurt slechts voor hoge paraquatconcentraties.

De 9:1 verhouding is voor lage paraquatconcentraties toxischer dan de 1:1 verhouding ; bij 100 ppb paraquat is de

remming maximaal ongeveer 40%. De toxiciteit van de combinatie paraquat met 9:1 uitvloeiers neemt minder vlug toe in functie van de paraquatkoncentratie dan voor 1:1. De isopleten zijn verder van elkaar gelegen dan in de twee andere figuren. Dit heeft voor gevolg dat de 50% remminglijn voor de 9:1 verhouding ongeveer samenvalt met de 50% lijn voor de 1:1 verhouding (Figuur 44D). De 50% lijn voor de 1:9 verhouding ligt er beduidend onder, m.a.w. deze combinatie is veel toxischer dan de eerste twee.

Uit deze resultaten blijkt duidelijk dat de vermindering van het toxisch effect van paraquat door toevoegen van uitvloeiers afhankelijk is zowel van het percentage toegediende uitvloeiers, als van de verhouding tussen ethomeen S25 en lissapol NX en tenslotte van de concentratie paraquat.

Het handelsprodukt "Gramoxone" door ICI England voor binnenlands gebruik bereid bevat 25% uitvloeiers. De overzeese formulering die wij gebruikten bevat 50% uitvloeiers. Uit de enkelvoudige bioassays met paraquat met en zonder uitvloeiers zoals beschreven in 5.2.5., werden de ED_{50} -waarden berekend :

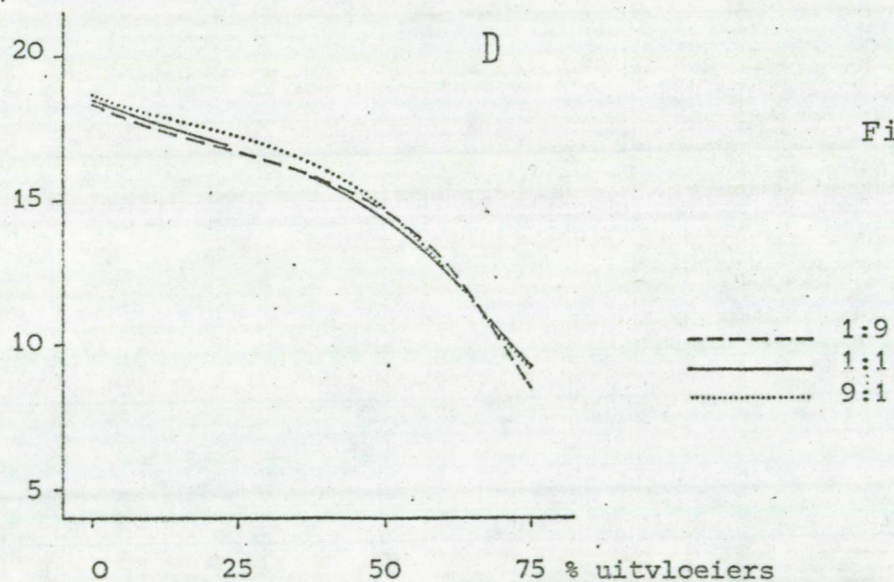
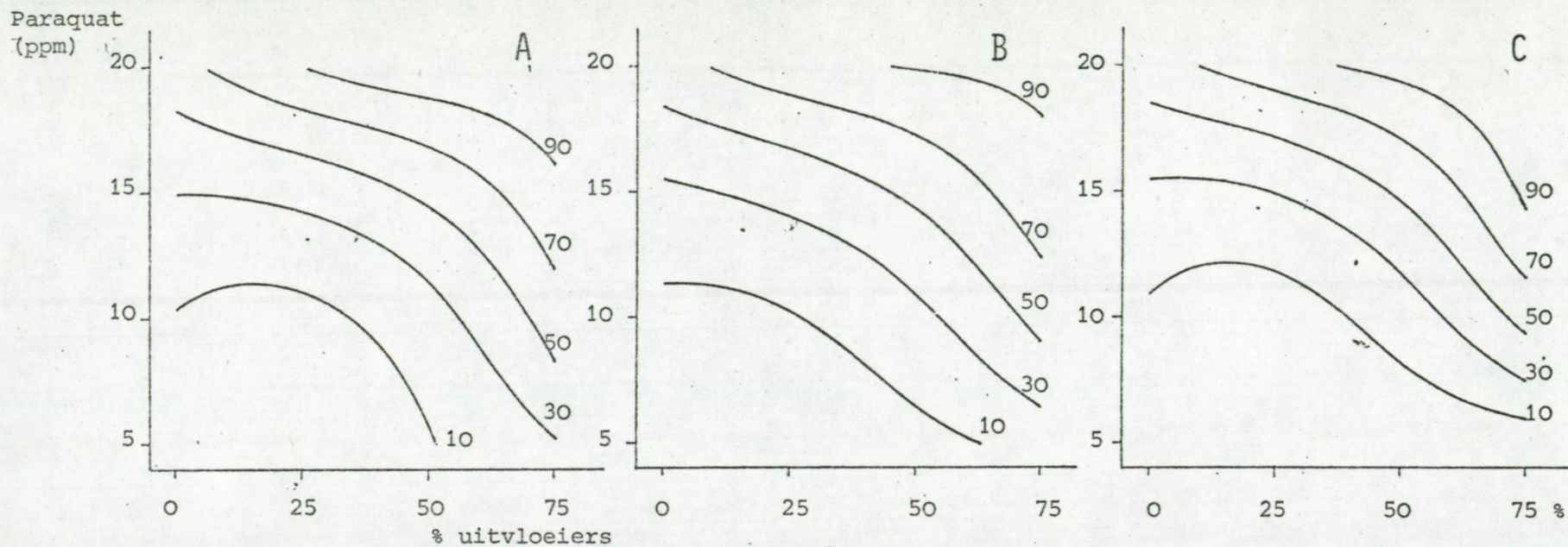
$$ED_{50} \text{ PMU} = 0.40 \quad ; \quad ED_{50} \text{ PZU} = 0.33 \text{ ppm}$$

De geringere toxiciteit van het uitgeteste paraquat met 50% uitvloeiers t.o.v. de toxiciteit van paraquat zonder uitvloeiers is te verklaren indien ethomeen S25 en lissapol NX in een verhouding van ongeveer 9:1 werden toegevoegd.

De exakte samenstelling van de "Gramoxone"-formulering werd ons door ICI Belgium vertrouwelijk medegedeeld (Dr. NIERINCK, pers.med.) en spreekt onze konklusies uit het faktorieel experiment niet tegen.

Een zeer opmerkelijk feit is bovendien dat lissapol NX, dat afzonderlijk 20x minder toxisch is voor Scenedesmus opoliensis dan ethomeen S25 (ED_{50} respectievelijk 37.5 ppm en 1.35 ppm) (zie 5.2.5.), het toxisch effect van paraquat sterker verhoogt dan ethomeen S25.

De hypotese die we in 5.2.6. vooropstelden voor het verklaren van het verschil in toxiciteit voor het wier Scenedesmus opoliensis van PZU en PMU, luidde als volgt : de tensio-actieve uitvloeiers kunnen met hun hydrofiele staart aan



Figuur 45 : 'Procentuele mortaliteit'-isoplethen van Poecilia reticulata i.f.v. de concentratie paraquat en het percent toegevoegde uitvloeiers. De uitvloeiers ethomeen S25 en lissapol NX werden in 3 verhoudingen toegediend :

A : 1:9
B : 1:1
C : 9:1

D : 50 % mortaliteit-isoplethen van de 3 verhoudingen.

het hydrofiele wierceloppervlak geadsorbeerd worden en kunnen aldus met hun lipofiele kop een scherm vormen tegen het hydrofiele paraquat-ion.

Het faktorieel experiment toont echter duidelijk aan dat alleen het kationisch ethomeen S25 een verlaging van de toxiciteit van PMU t.o.v. PZU voor gevolg heeft, en dat in tegendeel het non-ionische lissapol NX de toxiciteit van PMU sterk verhoogt.

Een nauwkeuriger verklaring is bijgevolg dat enkel ethomeen S25 en niet lissapol NX een zekere blokkering van de paraquatopname veroorzaakt. Dit kan gebeuren doordat ethomeen S25 preferentieel aan de wiercellen wordt geadsorbeerd ofwel doordat ethomeen S25 met paraquat in bepaalde concentraties een inactief kompleks vormt. Paraquat en ethomeen S25 hebben echter dezelfde lading waardoor de eventuele kompleksvorming zeker niet het gevolg is van een elektrostatische aantrekking tussen de twee componenten.

6.3.3.2. Poecilia reticulata

In de vergelijking van de drie proeven met Poecilia reticulata waarbij de combinatie van de mengsels van ethomeen S25 en lissapol NX in een verhouding 1:9, 1:1 en 9:1, met paraquat werden uitgetest, is het opvallend dat de isopleten voor de 3 proeven bijna samenvallen. Dit geldt voornamelijk voor de 50% mortaliteit isopleten (Figuur 45D). Voor lage paraquatconcentraties bestaat er enig verschil :

Toevoeging van 75% detergenten aan 5 ppm paraquat in een verhouding van 1:9 ethomeen S25/lissapol NX, heeft 30% mortaliteit voor gevolg, in een 1:1 verhouding slechts 20%, en in een 9:1 verhouding nog geen 10% (Figuur 45A, B en C).

De twee uitvloeiers afzonderlijk zijn bijzonder toxisch voor P. reticulata (zie 5.5.3.). De TL_{50}^{96} -waarden van ethomeen S25 en lissapol NX zijn respectievelijk 2.4 en 12.5 ppm. De TL_{50}^{96} -waarde voor PZU is 22 ppm.

Het is bijgevolg merkwaardig dat de combinatie van 9 delen van het meest toxische produkt ethomeen S25 met 1 deel lissapol NX, in lage paraquatconcentraties, minder toxisch is

dan de combinatie met een mengsel van 1:9 ethomeen S25/lissapol NX. Voor hoge paraquatkoncentraties wordt bij combinatie met het mengsel van 9:1 ethomeen S25/lissapol NX de tolerantielimiet van P. reticulata voor ethomeen S25 overschreden en wordt de toxiciteit van paraquat wel beduidend vermeerderd.

Naast hun "wetting" eigenschappen zijn de uitvloeiers in staat de eigenschappen van de biologische membranen te wijzigen. In het geval van de vis Poecilia reticulata is dit mechanisme zeer waarschijnlijk verantwoordelijk voor de verhoogde toxiciteit van PMU t.o.v. deze van PZU. Immers, de toegediende uitvloeiers zijn zelf schadelijke produkten die ernstige kieuwbeschadiging voor gevolg hebben. Hierdoor wordt de gastuitwisseling belemmerd en verliezen de membranen hun osmotische of ionische stabiliteit (ABEL, 1974).

Uit andere proeven met vissen bleek dat de toxiciteit van paraquat steeds werd verhoogd door het toevoegen van detergenten (CARTER & WILLIAMS, 1968).

6.3.4. Besluiten

1) Als konklusie uit deze twee faktoriële experimenten kunnen we stellen dat de toxiciteit van een formulering zelden uitsluitend door de hoeveelheid aanwezige aktieve stof wordt bepaald. Sommige additieven zijn zelf zeer toxische produkten. Doch zelfs met de kennis van de toxiciteit van elk van de componenten is het onmogelijk voorspellingen te doen in verband met de toxiciteit van een bepaald mengsel.

2) Uit de proeven met Scenedesmus opoliensis blijkt dat de interacties tussen paraquat en de twee uitvloeiers verschillen in functie van de absolute concentratie van elk van de componenten. In sommige combinaties kan men een "antagonisme" tussen de toxikanten waarnemen i.p.v. de meer voor de hand liggende additieve of synergistische werking.

In de bioassays met PMU en PZU afzonderlijk (zie 5.2.5.) werd deze antagonistische werking ook teruggevonden. Het is bijgevolg mogelijk aan de hand van een vergelijking van deze biologische toetsen de samenstelling van PMU te achterhalen.

3) Zowel voor de vis Poecilia reticulata als voor het groenwier Scenedesmus opoliensis is lissapol NX minder toxisch dan ethomeen S25. Toch wordt de toxiciteit van paraquat voor deze organismen meer verhoogd door het toevoegen van lissapol NX dan door het toevoegen van ethomeen S25.

In het geval van S. opoliensis werd hiervoor, en ook voor het waargenomen antagonisme tussen de uitvloeiers en paraquat, een verklaring gezocht in de tensio-aktieve eigenschappen en de lading van de detergenten : ethomeen S25 schermt de wiercellen af tegen het effect van paraquat.

In het geval van P. reticulata menen wij dat voornamelijk de eigenschap van de detergenten om de permeabiliteit van biologische membranen te wijzigen, de toxiciteit van paraquat met uitvloeiers beïnvloedt.

6.4. Vergelijking van de resultaten van de faktoriële experimenten met de resultaten van de gewone bioassays op wieren, crustaceeën en vissen

Uit vorige hoofdstukken blijkt dat er een groot verschil bestaat tussen de verschillende testorganismen wat betreft het effect van de detergenten op de toxiciteit van paraquat :

1) Voor de twee wiersoorten Scenedesmus opoliensis en Chlamydomonas reinhardi is tegen alle verwachtingen in de commerciële formulering van paraquat met uitvloeiers (PMU) (gramoxone genaamd) minder toxisch dan paraquat zonder uitvloeiers (PZU) (gramoxone ZU genaamd).

Dit is ook zeer sterk het geval met de larven van de estuariene modderkrab Rhithropanopeus harrisii. De cladoceren Daphnia magna en Daphnia pulex vertonen echter geen noemenswaardig verschil in het effect van PMU en van PZU. Voor al deze soorten is lissapol NX minder toxisch dan ethomeen S25 en zijn de uitvloeiers minder toxisch dan het herbicide zelf.

Uit het faktorieel experiment is gebleken dat een antagonistisch effect tussen de detergenten en het herbicide, zoals bij S. opoliensis wordt waargenomen, afhankelijk is van de samenstelling en de concentratie van het mengsel. Indien 25 à 50% van de twee uitvloeiers aan paraquat wordt toegevoegd

met overmaat ethomeen S25, wordt het effect van paraquat verkleind. In alle andere gevallen werken de produkten synergistisch. Lissapol NX heeft niettegenstaande zijn lagere individuele toxiciteit toch een grotere synergistische werking met paraquat dan ethomeen S25.

Het is duidelijk dat voor al deze soorten niet zo zeer het eigen toxisch effect van de uitvloeiers (bv. het beschadigen van de membraansystemen wegens eiwitdenaturatie) van belang is voor de toxiciteit van PMU, maar wel de fysische eigenschappen van deze produkten (adsorptie, tensio-actieve eigenschappen). Vandaar dat de interakties zo sterk kunnen variëren naargelang de samenstelling van het mengsel.

2) Vissen daarentegen zijn zeer gevoelig voor detergenten ; de verhoogde membraanpermeabiliteit, vnl. ter hoogte van het kieuwepiteel, is verantwoordelijk voor de verhoogde toxische werking van PMU t.o.v. PZU. Het effect van de detergenten op het kieuwepitheel is een irreversiebel proces.

Hier speelt de individuele toxiciteit van de detergenten wél een belangrijke rol in de toxiciteit van het mengsel. Een voorbeeld hiervan : er is een groter verschil in het effect van PMU en het effect van PZU bij Brachydanio rerio dan bij Poecilia reticulata. Dit kan verklaard worden doordat B. rerio gevoeliger is voor de detergenten dan P. reticulata. Een ander voorbeeld : B. rerio-eieren zijn gevoeliger dan de larven zowel voor PMU als voor de beide uitvloeiers.

Dat er echter ook een interactie tussen de componenten van het mengsel bestaat, wordt bewezen door het feit dat lissapol NX een kleiner afzonderlijk effect heeft op P. reticulata dan ethomeen S25, maar dat het toch een groter synergistisch effect met paraquat vertoont dan ethomeen S25.

We kunnen onze vaststellingen als volgt samenvatten :

- De individuele toxiciteit van detergenten berust grotendeels op een verhoging van de membraanpermeabiliteit en in hogere concentraties op het beschadigen van de membraansystemen.
- Organismen zoals de groenwieren Scenedesmus opoliensis en Chlamydomonas reinhardi, de crustaceën Daphnia magna,

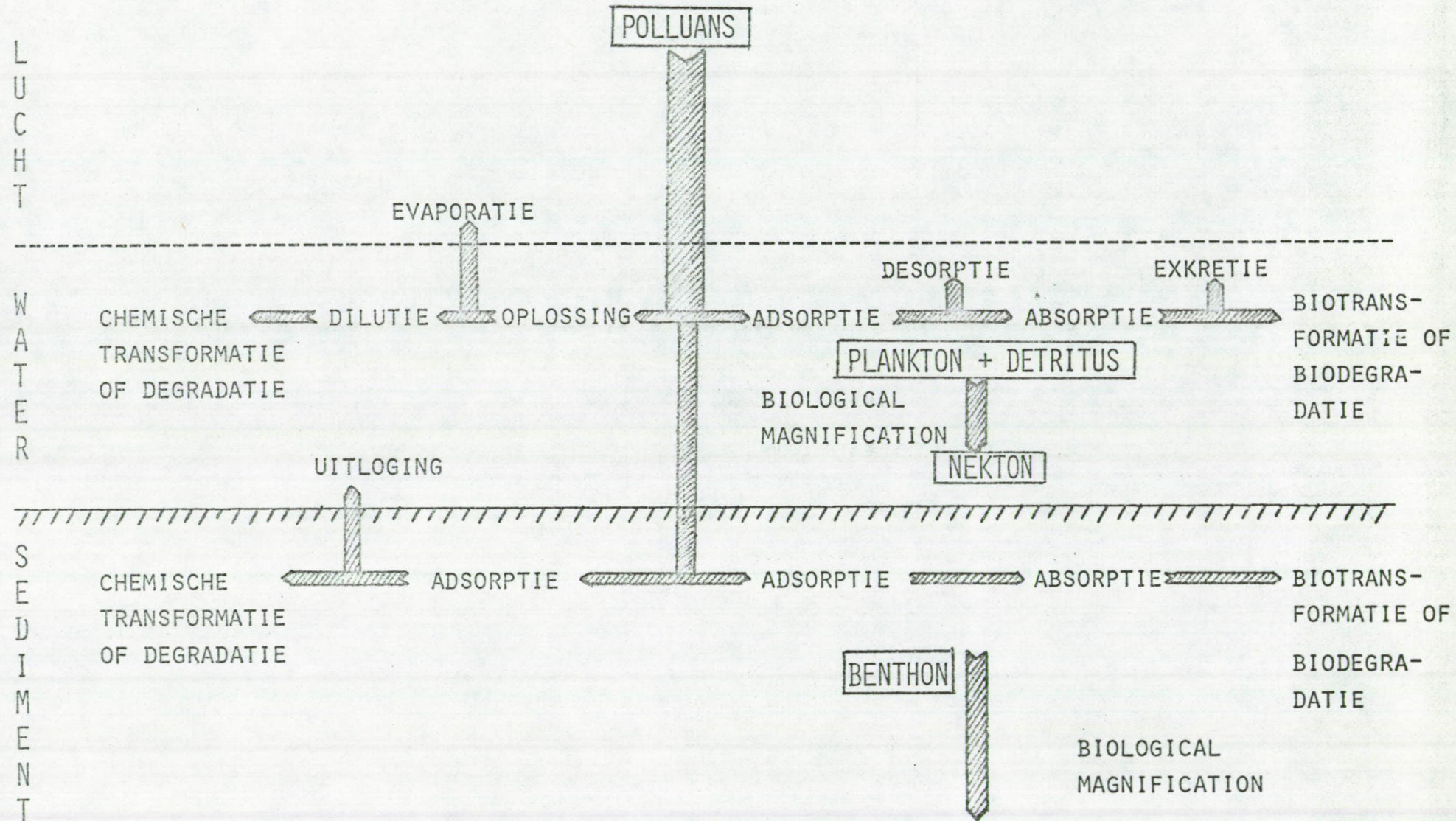
Daphnia pulex en Rhithropanopeus harrisii zijn relatief goed bestand tegen dit effect van de detergenten lissapol NX en ethomeen S25. Daarentegen zijn vissen (adulten, eieren en larven) veel gevoeliger voor de uitvloeiers dan voor paraquat.

- Door het feit dat de doorlaatbaarheid van de membranen (waarlangs paraquat wordt opgenomen) door de detergenten wordt verhoogd, vermeerdert ook het effect van PMU t.o.v. het effect van PZU.

Voor vissen ligt dit effect aan de basis van het verschil in toxiciteit tussen PMU en PZU. Er is echter één belangrijke opmerking : het individueel effect van de tensio-actieve stof is niet eenvoudig te korreleren met het effect van een mengsel.

- Voor testorganismen die beter beschermd zijn tegen de invloed van detergenten, spelen daarentegen de fysische en tensio-actieve interacties tussen het paraquat, de detergenten en de organismen een grote rol in het toxiciteitsverschil tussen PMU en PZU. De biologische membranen worden niet onmiddellijk irreversiebel aangetast, maar er bestaan hydrofiel-lipofiel-interacties en adsorptieverschijnselen tussen het paraquat, de detergenten en de organismen waardoor het mogelijk wordt dat in sommige gevallen antagonistische werkingen optreden.

Figuur 45bis: Partitionering van een polluans in een aquatisch ecosysteem (naar BENIJTS en PERSOONE, 1976).



7. PARTITIONERING VAN HERBICIDEN IN EEN AQUATISCH ECOSYSTEEM

7.1. Inleiding

Pesticiden worden opgenomen en verspreid in de gasvormige, vloeibare en vaste fase van het milieu.

Figuur 45 bis (naar BENIJTS & PERSOONE, 1976)⁽¹⁾ geeft een tentatief schema weer van de diverse richtingen langswaar een produkt in het aquatisch systeem verspreid wordt.

Wanneer een produkt in de waterige fase van het aquatisch ecosysteem terecht komt gebeurt de "partitionering" ervan in de eerste plaats volgens de fysische en chemische eigenschappen van dit produkt : vluchtigheid, oplosbaarheid, adsorptiegraad, hydrostatische bindingen, enz...

Van zodra een produkt in het waterig milieu is opgelost, wordt het naargelang de dynamiek van het systeem en de startkoncentratie van het produkt, in min of meerdere mate gedilueerd. Andere oorzaken van de daling in concentratie van een chemische stof in het vloeibaar medium, zijn de verdamping van het produkt en/of chemische of fotochemische omzettingen.

Terzelfdertijd komt het produkt in contact met beweeglijke of onbeweeglijke substraten, waaraan het min of meer sterk gaat adsorberen, of indien het om levende organismen gaat, waarin het eveneens kan worden geabsorbeerd. Via desorptie en/of exkretie, kan het produkt, veranderd of onveranderd, terug aan het medium worden vrijgegeven.

De voornaamste substraten waaraan of waarin een pesticide in een aquatisch ecosysteem kan worden geakkumuleerd zijn enerzijds, het plankton, het nekton, de watervegetatie en partikels in suspensie, en anderzijds, de sedimenten met het mikro-, meio- en makrobenthon.

De verspreiding van een produkt wordt dus in de tweede plaats bepaald door de fysische en chemische eigenschappen van de substraten van belang.

Bij het adsorptieproces zijn in dit verband voornamelijk de chemische konfiguratie en de elektrische potentiaal van het substraat van belang.

De opname van een produkt binnen een organisme of de ab-

(1) Sytase-rapport voor het I.C.W.B.-Projekt Noordzee (niet gepubliceerd).

sorptie wordt voornamelijk bepaald door het transport doorheen biologische membranen en cellulaire barrières. Op zijn beurt is dit transport afhankelijk van de fysische en chemische eigenschappen van deze barrières.

De adsorptie sluit de absorptie niet uit doch dit eerste fenomeen gebeurt sneller en bereikt ook sneller een plateau ; het uitwendig oppervlak van een organisme is immers vlugger verzadigd aan een bepaald produkt dan het inwendig milieu van het organisme.

De desorptie van geadsorbeerd materiaal gebeurt meestal vlugger dan de exkretie van geabsorbeerd materiaal. Nochtans kunnen bij geadsorbeerde polaire stoffen de hydrostatistische bindingen met het substraat zodanig sterk zijn, dat het adsorptieproces bijna irreversiebel lijkt.

Het geabsorbeerd materiaal kan ten slotte in het organisme een biotransformatie of biodegradatie ondergaan.

De akumulatie van chemikaliën in de primaire producenten (nanoplankton en fytoplankton) die het grootste deel van het substraatoppervlak vertegenwoordigen, wordt normaliter gevolgd door een opname van laatstgenoemde organismen door het zoöplankton ; het zoöplankton dient op zijn beurt als voedsel voor hogere organismen. Naast de dosis die door elk van deze organismen rechtstreeks wordt opgehoopt, kan dus een additionele hoeveelheid toxikans via de voedselbaan worden geakkumuleerd ("biological magnification").

De grote kompleksiteit van de ad-, ab- en desorptiekinetiek wordt nog vermeerderd door de grote diversiteit van de biota in het waterig ecosysteem en door de ingewikkelde fysiocochemische dynamiek van het milieu.

Het is bijgevolg een zeer moeilijke opdracht om na te gaan welk effect een bepaald toxikans (om niet te spreken van mengsels) heeft op de biologische gemeenschappen in een bepaald ecosysteem.

De meest algemeen gebruikte middelen hiertoe zijn, enerzijds de toxikologische experimenten zoals reeds in vorige hoofdstukken werden behandeld, en anderzijds de proeven waarin de partitionering van een bepaald produkt in een bepaald milieu wordt bestudeerd.

In de volgende hoofdstukken zullen wij achtereenvolgens de accumulatie van de onderzochte herbiciden behandelen ter hoogte van de sedimenten, de accumulatie bij de gesuspendeerde wiercellen Scenedesmus opoliensis en de accumulatie bij de vis-sen Poecilia reticulata en Brachydanio rerio.

7.2. Adsorptie aan de sedimenten

7.2.1. Inleiding

De partitionering van herbiciden in een akwatisch ecosysteem wordt eerst en vooral bepaald door de adsorptiegraad van deze produkten aan het sediment. De adsorptiecapaciteit van de sedimenten is omzeggens onbeperkt in vergelijking met de concentraties herbicide die gemiddeld in het water terecht komen. Hierdoor is het mogelijk dat de aangewende dosis binnen korte tijd, na de behandeling, bijna volledig uit het waterig milieu is verdwenen. Eens geadsorbeerd aan het sediment zijn de herbiciden praktisch zonder effect op de pelagische fauna en flora van het waterig systeem.

Ofschoon we dit aspect zelf niet hebben onderzocht hebben we een syntese gemaakt van de gegevens uit de literatuur hieromtrent :

7.2.2. Adsorptie van paraquat en diquat

Paraquat en diquat zijn twee sterk wateroplosbare organische kationen en worden sterk geadsorbeerd aan partikels met kationen-uitwisselende eigenschappen. De adsorptie- en desorptie-karakteristieken van deze twee herbiciden en de invloed van pH en temperatuur op dit proces werden bestudeerd door HARRIS & WARREN (1964), COATS et al. (1966), WEBER et al. (1965), CORBIN et al. (1965), FRANK & COMES (1967), FRANK (1970), TUCKER et al. (1967), CLARK (1971), BURNS et al. (1973), BURNS & HAYES (1974), KHAN et al. (1975), FRYER et al. (1975), GAMAR & MUSTAFA (1975), en anderen.

De samengevatte bevindingen van deze auteurs zijn :

1. Paraquat en diquat worden sterk geadsorbeerd aan montmorilloniet, Fuller's aarde, kationenuitwisselaars en organisch

bodemmateriaal ; minder sterk aan zand en leemzand en weinig of niet aan polystyreenhars, houtskool en anionenuitwisselaars.

Paraquat en diquat desorberen veel gemakkelijker uit zand dan uit bodem rijk aan klei of organische stoffen.

2. Het adsorptiemechanisme van paraquat is hoofdzakelijk fysisch, te wijten aan een ionenuitwisselingseffekt ; een fraktie van het paraquat blijft irreversibel geadsorbeerd en onbereikbaar voor biodegradatie (PIERCE et al., 1971)
3. De hoeveelheid geadsorbeerd materiaal blijkt niet afhankelijk te zijn van de pH, de temperatuur of de expositieduur.
4. Bij concentraties gebruikt voor de verdelging van de watervegetatie (enkele ppm) worden deze herbiciden in de waterige fraktie meestal niet teruggevonden na 5 tot 8 dagen en vrijwel nooit meer na 10 tot 14 dagen (FRANK, op.cit.). Zij worden immers snel door de sedimenten geadsorbeerd waarin ze maanden persisteren.

KHAN et al. (op.cit.) vonden na 5 maand nog steeds eenzelfde concentratie residu in de bodem. Uit de tabel van FRANK & COMES (op.cit.) (Tabel 39) blijkt dat het gehalte paraquat in de bodem slechts begin te dalen vanaf 56 dagen en het gehalte diquat pas na 160 dagen.

Days after treatment	2,4-D		Paraquat		Diquat		Endothall
	Water	Soil	Water	Soil	Water	Soil	Water
1.....	0.024	4.96	0.55	3.56	0.49	0.47	0.15
2.....	0.029	2.40	0.48	11.70	0.12	0.85	0.18
4.....	0.034	1.02	0.21	36.90	0.01	2.14	0.11
8.....	0.048	2.67	0.02	42.16	<0.001	1.23	0.017
12.....	0.053	0.60	<0.001	42.12		5.38	0.023
18.....	0.067	0.45		35.46		7.40	0.002
24.....	0.019	0.66		47.23		20.12	0.001
36.....	<0.001	0.06		37.82		12.57	<0.001
56.....		0.10		20.51		36.80	
85.....		<0.005		10.73		35.55	
160.....						24.23	

*Each value is the average of three samples taken from the same pond.

Tabel 39 : Residus (in ppm) in het water en de sedimenten van vijvers behandeld met 2,4-D, paraquat of diquat. De concentratie in het water bij de start is respectievelijk 1.33, 1.14 en 0.62 ppm (naar FRANK & COMES, 1967).

7.2.3. Adsorptie van 2,4-D

Polaire stoffen waaronder de chlorofenoxyderivaten kunnen aan de bodempartikels geadsorbeerd worden maar persisteren er slechts voor een relatief korte duur : maximum 1 jaar

(PIERCE et al., 1971), dit in tegenstelling met niet polaire stoffen, zoals gechloreerde KWS die tot 30 jaar kunnen persisteren.

De adsorptie en desorptiekinetiek werd bestudeerd door ALY & FAUST (1964), FRANK & COMES (1967), FRANK (1970), PIERCE et al. (1971), SCHULTZ (1973), SAXENA et al. (1974), SUFFLING et al. (1974), KHAN (1974), SCHULTZ & WHITNEY (1974), SCHULTZ & HARMAN (1974), DIEGUEZ-CARBONELL & PASCUAL (1974), en anderen.

Uit al deze onderzoeken blijken volgende vaststellingen :

1. 2,4-D wordt snel geadsorbeerd aan montmorilloniet al dan niet gekombineerd met een humuszuur, en aan organo-kleikomplexen (zoals bv. in podzolbodems). De adsorptie gebeurt minder snel door aktieve kool en kleipartikels alleen. Het produkt adsorbeert praktisch niet aan agar.
De desorptie uit bodems rijk aan klei en organisch materiaal is te verwaarlozen in het eerste jaar na de behandeling.
2. De 2,4-D adsorptie aan het organoklei-kompleks is fysisch van het "Van der Waals"-type.
3. De adsorptiegraad stijgt bij dalende pH en dalende temperatuur.
4. Vanaf de eerste dag na het toedienen in het water is het gehalte teruggevonden in het water veel lager dan de startconcentratie. 2,4-D wordt snel geadsorbeerd aan de sedimenten, waarin het een wisselende tijd persisteert, meestal slechts een 7-8 dagen, maar gaande tot maximum een jaar (Tabel 39). Het verdwijnen uit de bodem is te wijten aan fotodegradatie en biodegradatie door bodemmikroorganismen.

7.3. Adsorptie van paraquat en diquat aan wiercellen *Scenedesmus opoliensis*

7.3.1. Inleiding

Naast de hoge adsorptie aan het sediment vermindert de paraquat en diquatconcentratie in het water ook door adsorptie aan plantenmateriaal in suspensie of aan de ondergedompelde makrofytenvegetatie.

Volgens SEAMAN & THOMAS (1966) akkumulieren de bladeren van 3 soorten waterplanten, ondergedompeld in een waterige diquat-oplossing, dit herbicide tot concentraties verscheidene malen groter dan deze van het omringend milieu. Deze adsorptie blijkt meer het gevolg te zijn van een fysische aantrekking van de kationen en de negatief geladen bladoppervlakten dan van chemische reacties (BRIAN, 1967).

De adsorptie en absorptie van 2,4-D door hogere planten blijft echter kwantitatief gering en gebeurt hoofdzakelijk via een metabolisatie van de molekule (VALENTINE & BINGHAM, 1974 ; COBLE et al. (1970).

Er zijn enkele argumenten om aan te nemen dat wieren zeer efficiënt herbiciden uit het water kunnen opnemen (WOYTALIK et al., 1971). Van een ganse reeks mikroskopische algen bleek nochtans alleen het groenwier Scenedesmus quadricauda in staat te zijn om het 2,4-D in zijn niet gedissocieerde zure vorm op te nemen (VALENTINE & BINGHAM, op.cit.) (licht zure pH en beter in duisternis dan in licht.

Deze adsorptie aan het fytoplankton kan als dusdanig de oorzaak zijn van het snel verdwijnen van 2,4-D in natuurlijke vijvers, zoals door FRANK & COMES (1967) werd aangetoond (zie Tabel 39). Het residu 2,4-D in de sedimenten is bovendien veel kleiner dan in het residu paraquat of diquat. Voor deze laatste twee produkten blijkt het gehalte in het water omgekeerd evenredig te zijn met de concentratie in het sediment.

Wij hebben gepoogd, aan de hand van twee laboratoriumproeven die hierna beschreven worden, de adsorptiegraad van beide dipyridyliums aan Scenedesmus opoliensis te bepalen.

7.3.2. Materiaal en methode

In een bioassay-rek voor wieren (zie 5.2.4.) werden 2x12 buizen opgesteld met telkens 100 ml van een 5 ppm paraquat of diquat-oplossing. De ene reeks van twaalf buizen werd belicht met 2 TL-lampen van 65 Watt op een afstand van 10 cm, de andere reeks werd in volledige duisternis gehouden. De luchtdoorborreling was in alle buizen dezelfde : 200+5 ml/min. De

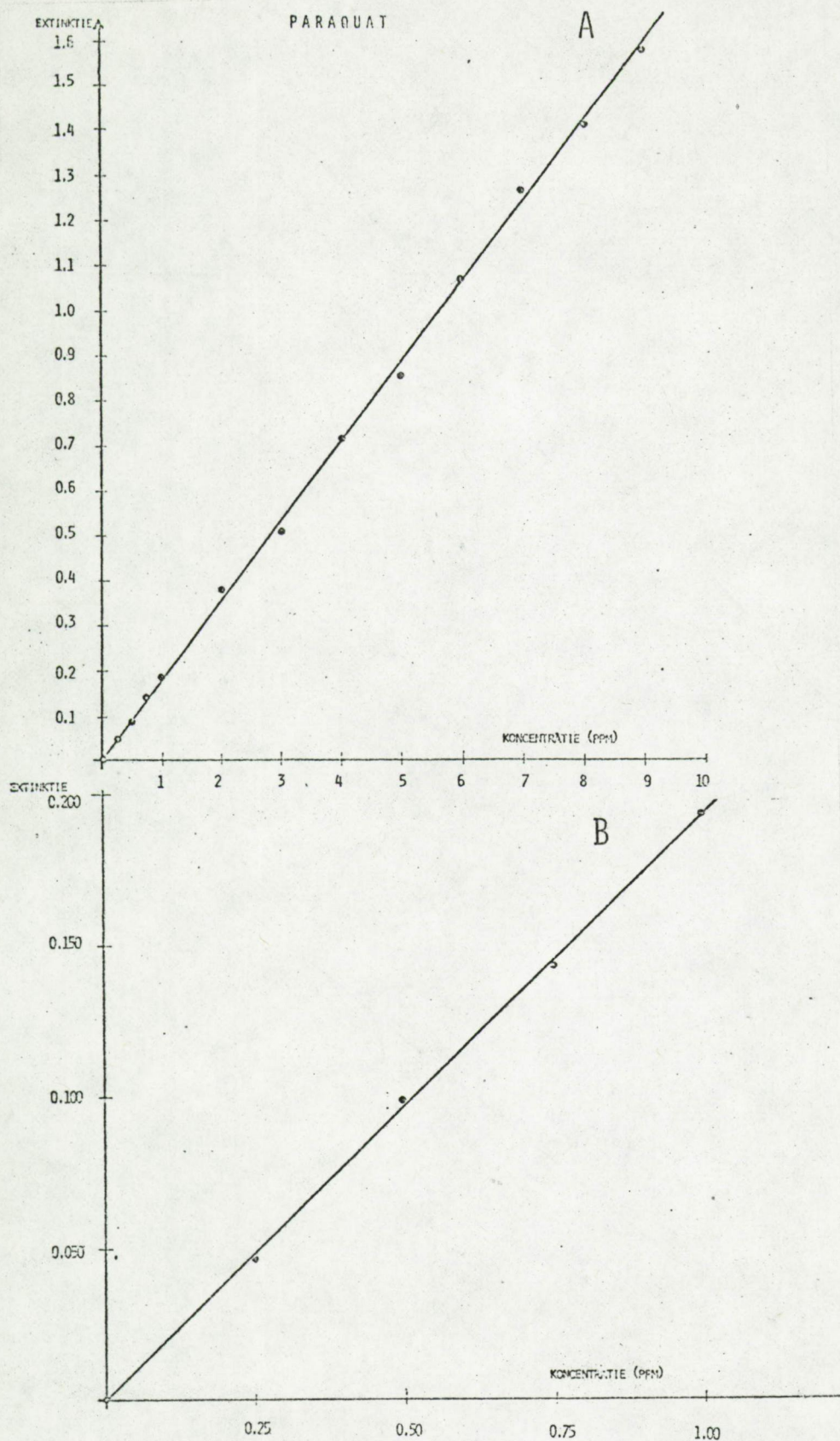
testtemperatuur bedroeg $23^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$.

Verschillende concentraties levende Scenedesmus opoliensis-coenobia werden in het medium geënt tot suspensies van respektievelijk 0.5, 5 en 10×10^6 cellen/ml. De proef werd in duplo opgesteld.

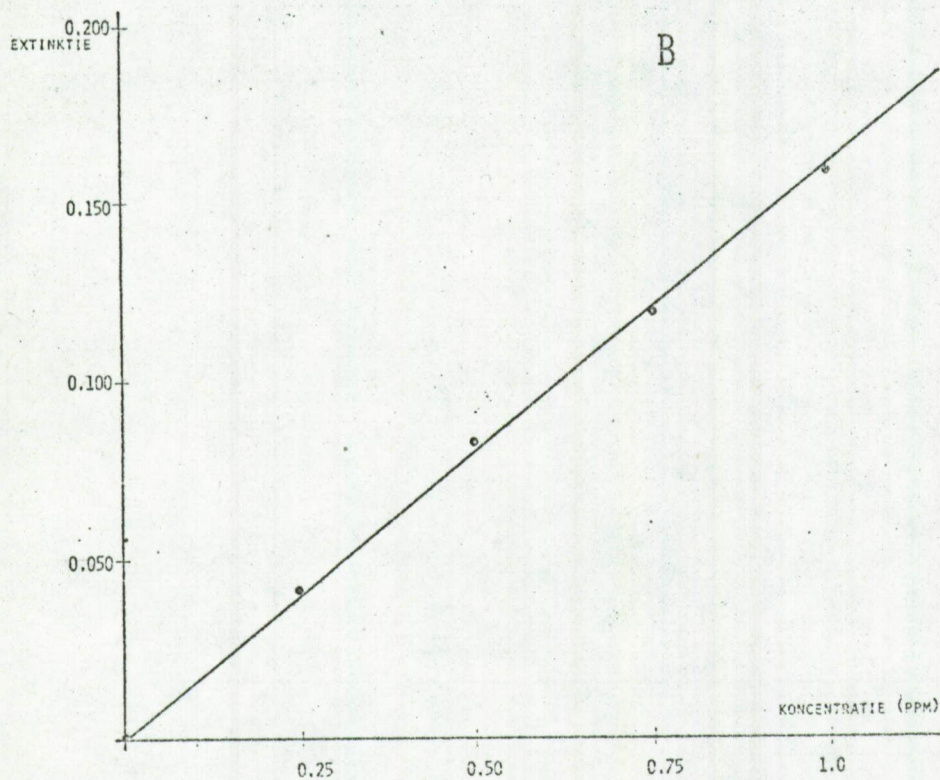
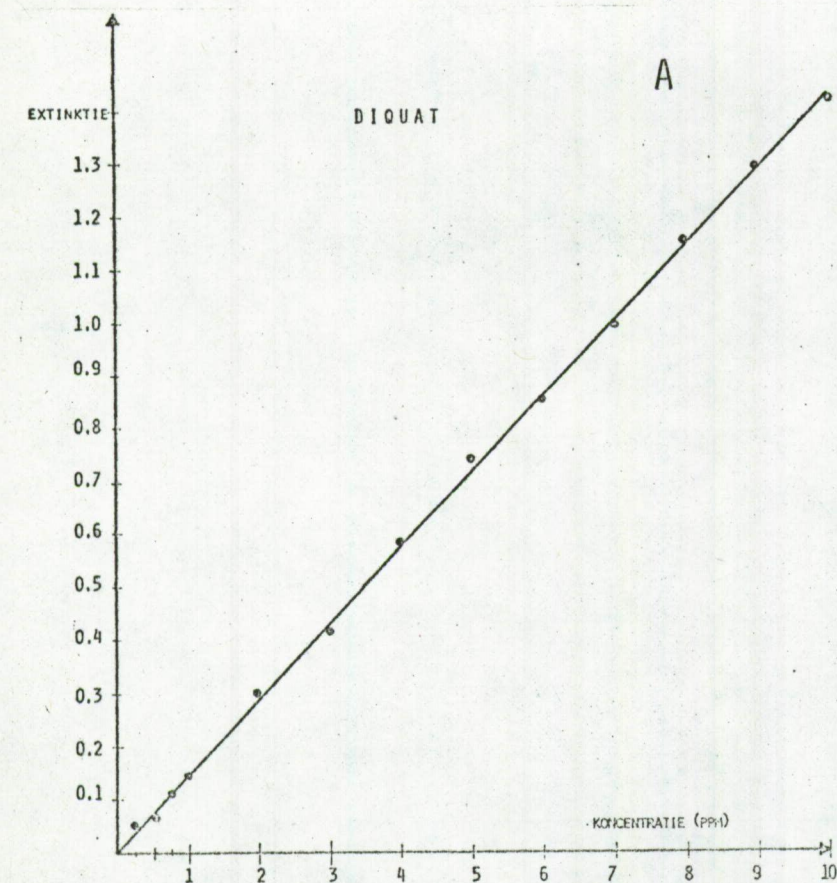
De adsorptie van paraquat en diquat aan levende wiercellen in functie van de tijd werd berekend aan de hand van de residuële concentratie in het testmedium. Onmiddellijk na het toevoegen van de wiercellen aan het medium, werd uit elke buis een staal van 5 ml genomen met een speciale Millipore injectiespuit met glasvezelfilter. Op die manier kon de vloeistof snel van de wiercellen gescheiden worden. Voor elk staal gebruikten we een nieuwe filter. Om de 30 minuten en later met grotere tussenpozen werd van elke kultuur een staal genomen.

De concentratie paraquat en diquat werd kolorimetrisch bepaald respektievelijk volgens de methode van CALDERBANK & YUEN (1965) en deze van CALDERBANK et al. (1961), beide steunend op een rechtstreekse kleurvorming na reductie met Na-dithioniet in alkalisch midden. Voor diquat werd de extinktie bepaald bij 379 nm en vervolgens bij 375, 383 en 385 nm. Voor paraquat werd de optische densiteit bepaald bij 396 nm en 392, 400 en 401 nm. Er werd gebruik gemaakt van een Zeiss spektrofotometer type PM Q II.

Een correctie voor de achtergrond-adsorptie werd gemaakt volgens de methode van MORTON & STUBBS (1946) : Hiervoor worden de extinkties genoteerd bij verschillende golflengten, vervolgens wordt op twee verschillende manieren een correctie gemaakt voor de "background adsorption", op basis van de hypothese dat deze "achtergrond-adsorptie" lineair is voor het smalle golflengtegebied dat werd onderzocht. Afwijkingen van deze lineariteit worden onmiddellijk waargenomen als er belangrijke verschillen zijn in de twee gekorrigeerde extinktiewaarden. Het research-team van ICI te Jealott's Hill in Engeland bepaalde de coëfficiënten van deze twee vergelijkingen voor het geval van diquat en paraquat. Voor diquat worden deze gekorrigeerde waarden berekend aan de hand van de vergelijkingen (PPRAM 5, 1972) :



Figuur 46 : Ijkkurven met paraquat (100.0% zuiver):
A: 1 -10 ppm (bij extinktie 1.0 werd de oplossing verdund)
B: 0.25 - 1.0 ppm



Figuur 47 : Ijkkurven met paraquat (100.0%zuiver)
 A: 1 - 10 ppm (bij extinktie 1.0 werd de oplossing verdund)
 B: 0.25 - 1.0 ppm

$$E_{379}^{\text{corrected 1}} = 3.79 E_{379} - 2.28 E_{375} - 1.52 E_{385}$$

$$E_{379}^{\text{corrected 2}} = 2.49 (2 \times E_{379} - E_{375} - E_{383})$$

waarbij E_{379} , E_{375} , E_{383} en E_{385} de extinktiewaarden zijn bij respektievelijk 379, 375, 383 en 385 nm.

Voor paraquat zijn de vergelijkingen (PPRAM 1, 1972) :

$$E_{396}^{\text{corrected 1}} = 2.91 E_{396} - 1.61 E_{392} - 1.28 E_{401}$$

$$E_{396}^{\text{corrected 2}} = 1.68 (2 \times E_{396} - E_{392} - E_{400})$$

waarbij E_{396} , E_{392} , E_{400} en E_{401} de extinktiewaarden zijn bij respektievelijk 396, 392, 400 en 401 nm.

Het gemiddelde tussen de twee gekorrigeerde waarden geeft de meest betrouwbare extinktiewaarde weer voor het onderzochte staal.

7.3.3. Resultaten

- Bepalen van de molaire extinktiecoëfficiënt :

Figuur 46 en 47 geven de door ons opgestelde ijkcurven weer voor analytisch zuiver paraquat-dichloride⁽¹⁾ en diquat-dibromide-monohydraat⁽¹⁾. Aflezingen kunnen nauwkeurig gebeuren tot een concentratie van 0.1 ppm voor beide dipyridyliums. De molaire extinktiecoëfficiënt berekend uit onze gegevens voor het diquat-kation is $\epsilon = 28000$. Dit is in overeenstemming met de molaire extinktiecoëfficiënt berekend door CALDERBANK et al. (1961). Voor het paraquat-kation zijn onze experimentele gegevens in overeenstemming met die van SHARP et al. (1972) wanneer deze laatste worden omgerekend van paraquat-dichloride tot paraquat-kation : $\epsilon = 32000$.

- Bepalen van de adsorptie aan glasvezelfilters :

Vooreerst werd het percentage paraquat of diquat bepaald dat gedurende de staalname aan de glasvezelfilter in de Millipore spuit adsorbeerde.

Uit de resultaten van een reeks van 20 stalen met 10 ppm paraquat en diquat konden we besluiten dat $8.90\% \pm 0.67$ van het di-

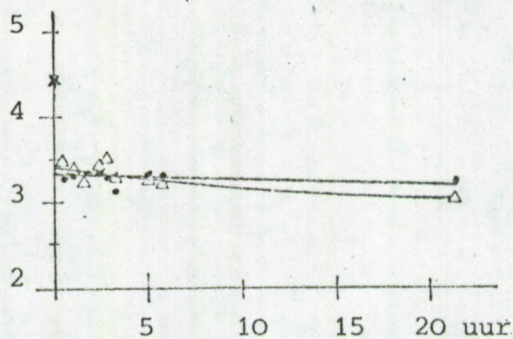
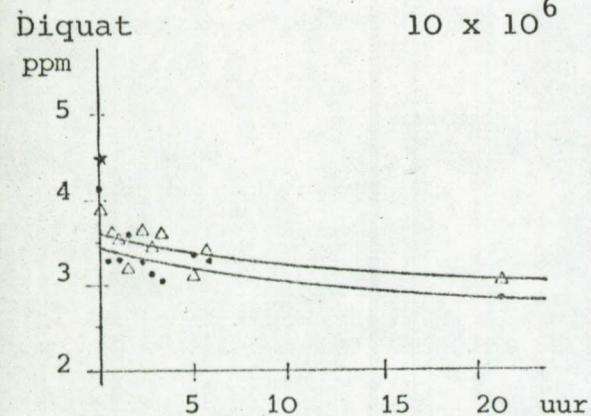
(1) Beide analytische produkten werden ons bezorgd door het laboratorium van ICI te Jealott's Hill, Berkshire, England.

LICHT

DONKER

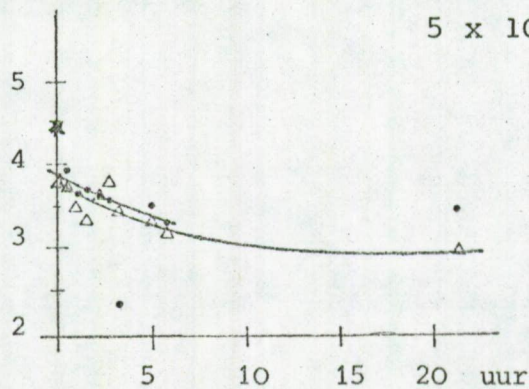
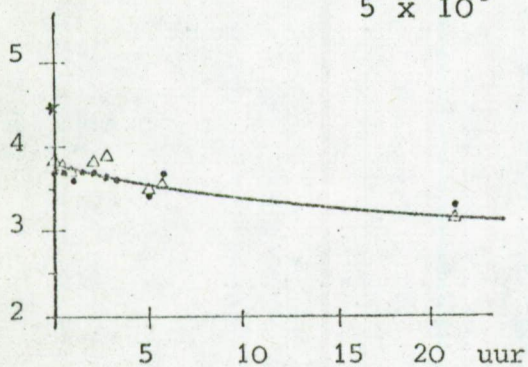
10×10^6

10×10^6



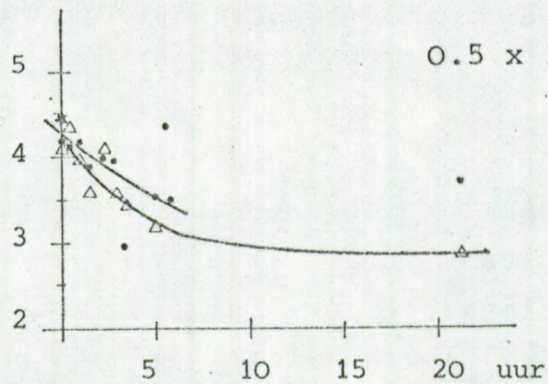
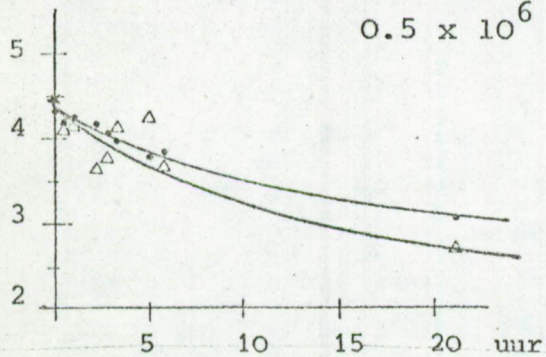
5×10^6

5×10^6



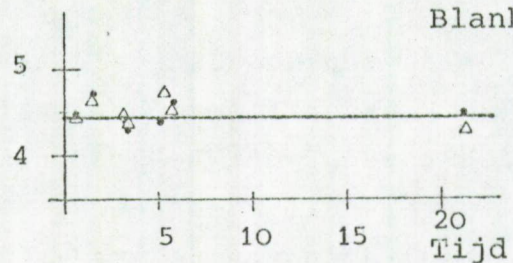
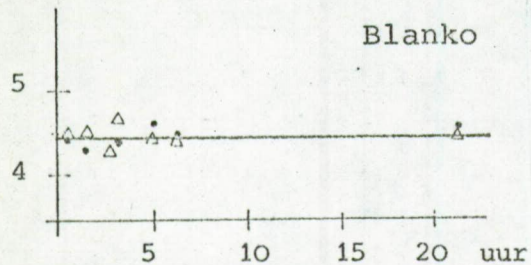
0.5×10^6

0.5×10^6



Blanko

Blanko



Figuur 48 : Akkumulatie in/aan Scenedesmus opoliensis-cellen.
A: in het licht.
B: in het donker.
Koncentratie diquat in het blanko-medium en in het medium met 0.5×10^6 , 5×10^6 en 10×10^6 wiercellen per ml i.f.v. de tijd.

quat aan de filter werd geadsorbeerd en $5.0\% \pm 0.26$ van het paraquat (betrouwbaarheidsgrenzen t.6 zijn berekend op het $p < 0.05$ niveau).

7.3.3.1. Akkumulatie van diquat

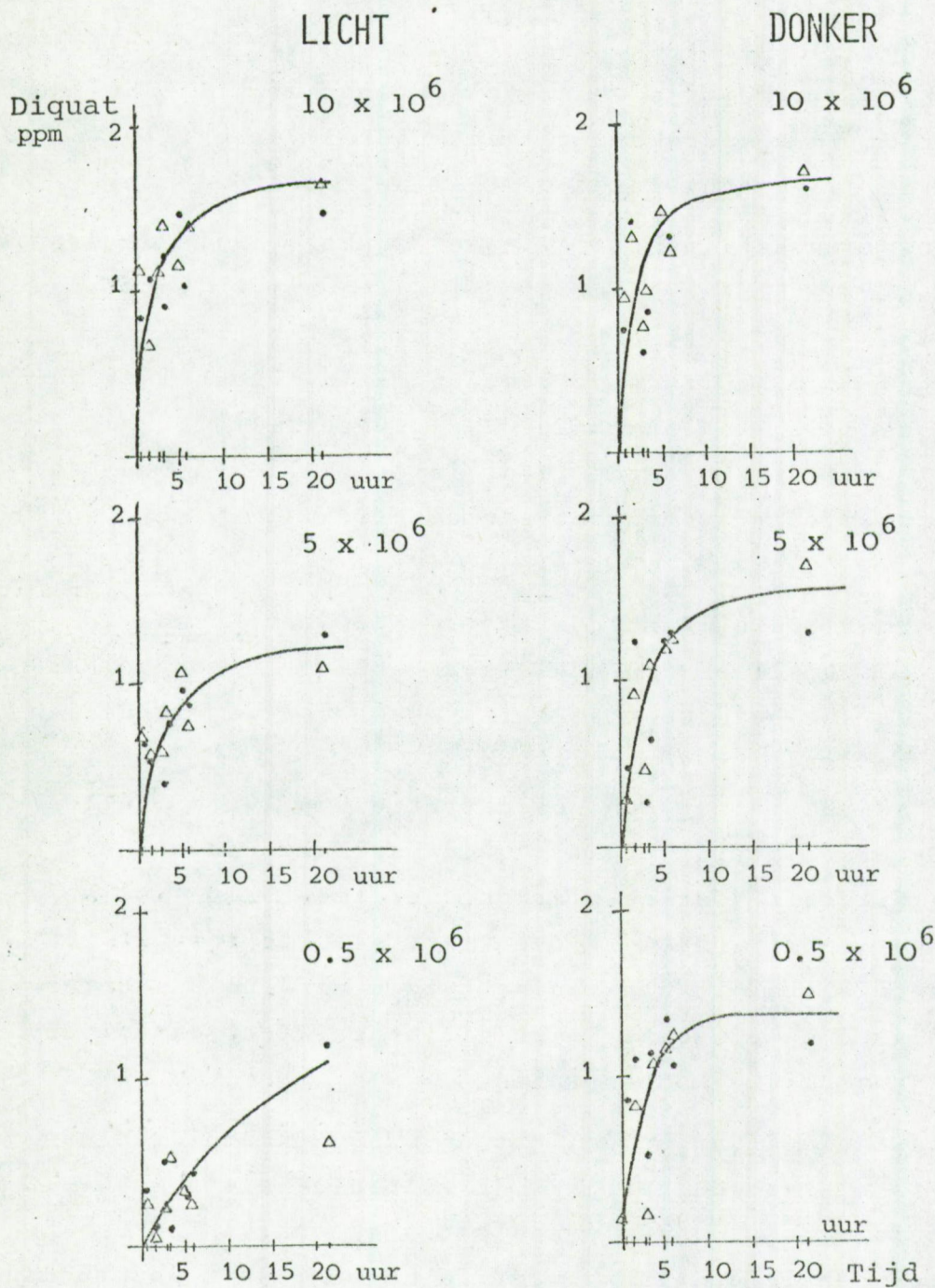
Figuur 48 geeft de concentratie van het medium (in ppm) in functie van de tijd weer, van de doorborrelingsbuizen in het licht en in het donker, telkens voor 3 verschillende wierkoncentraties en één blanco-opstelling zonder wieren.

Zowel in het licht als in het donker blijft de diquat-koncentratie in de blanco konstant, nl. 4.45 ppm. T.o.v. de oorspronkelijke 5 ppm betekent dit dat er 8.9% diquat niet wordt teruggevonden. Dit stemt overeen met de hoeveelheid diquat die tijdens de staalname aan de glasvezelfilter wordt geadsorbeerd. Deze blankowaarde wordt in de grafieken voor de testopstellingen weergegeven met een asterisk.

Uit de grafieken blijkt dat de adsorptie van diquat verhoogt naarmate de celkoncentratie van de Scenedesmus-suspensie stijgt. Niet alleen de totale geakkumuleerde hoeveelheid doch vooral de snelheid waarmee het produkt aan de wiercellen wordt geakkumuleerd, is verschillend.

Bij een wiersuspensie met een concentratie van 10×10^6 cellen/ml is vanaf de eerste meting praktisch de maximale hoeveelheid diquat geakkumuleerd. Voor de wierkoncentraties 5×10^6 cellen/ml en 0.5×10^6 cellen/ml wordt dit evenwicht slechts bereikt na 5 uur. Het celaantal in elk van de buizen werd na 24 uur nagegaan : in geen enkel geval wijkt dit aantal meer dan 5% af van de oorspronkelijke concentratie.

De invloed van de belichting op de akkumulatie aan wiercellen is niet zo duidelijk. Er valt alleen een ietwat grotere spreiding van de duploresultaten en ook van de opeenvolgende metingen in de blanco waar te nemen in het donker dan in het licht. Daarom wordt in Figuur 49 telkens het verschil weergegeven tussen de gemeten concentratie diquat in de test-media en in de respektievelijke blanco-opstelling. Op die manier wordt automatisch een korrektie gemaakt voor de adsorptie aan de glaswand en de filter.



Figuur 49 : Akkumulatie in/aan Scenedesmus opoliensis-cellen.
 A : in het licht
 B : in het donker
 Residu diquat in 0.5×10^6 , 5×10^6 en 10×10^6
 wiercellen / ml i.f.v. de tijd.

Uit deze figuur is het duidelijk dat na 5 uur de Scedesmus-cellen zowel in het licht als in het donker praktisch verzadigd zijn aan diquat. Analooq vonden KHAN & KHAN (1974) dat een suspensie (21000 cellen/ml) van een verwante wiersoort Ankistrodesmus spiralis na 4 tot 8 uur volledig verzadigd was aan fotodioldrin.

Na 5 uur inkubatie verschilt het gehalte aan diquat van de kulturen in het donker weinig in functie van stijgende wierkoncentraties : door de suspensies met 10×10^6 , 5×10^6 en 0.5×10^6 cellen/ml werd respektievelijk 1.45 ppm, 1.3 ppm en 1.2 ppm diquat geakkumuleerd van de 5 ppm oorspronkelijk in het medium aanwezig.

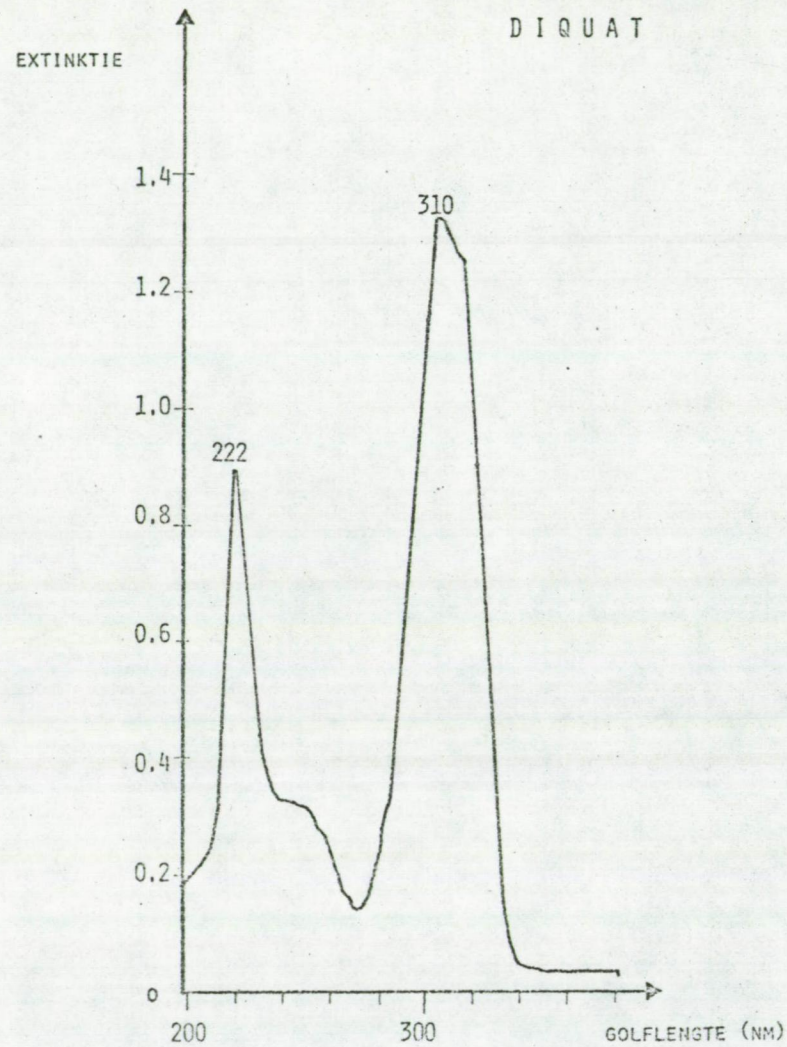
In het licht daarentegen is na 5 uur het gehalte aan diquat dat werd geakkumuleerd wél gekorreleerd met de wierkoncentratie : de kulturen met 10×10^6 , 5×10^6 en 0.5×10^6 cellen/ml akkumuleerden respektievelijk 1.4 ppm, 0.95 ppm en 0.4 ppm van de oorspronkelijk 5 ppm diquat uit het medium. In de test met de laagste concentraties aan wieren wordt diquat uit een medium met een concentratie van 5 ppm bijgevolg meer en vlugger geakkumuleerd in het donker dan in het licht.

7.3.3.2. Opmerking in verband met de kolorimetrische bepaling van diquat

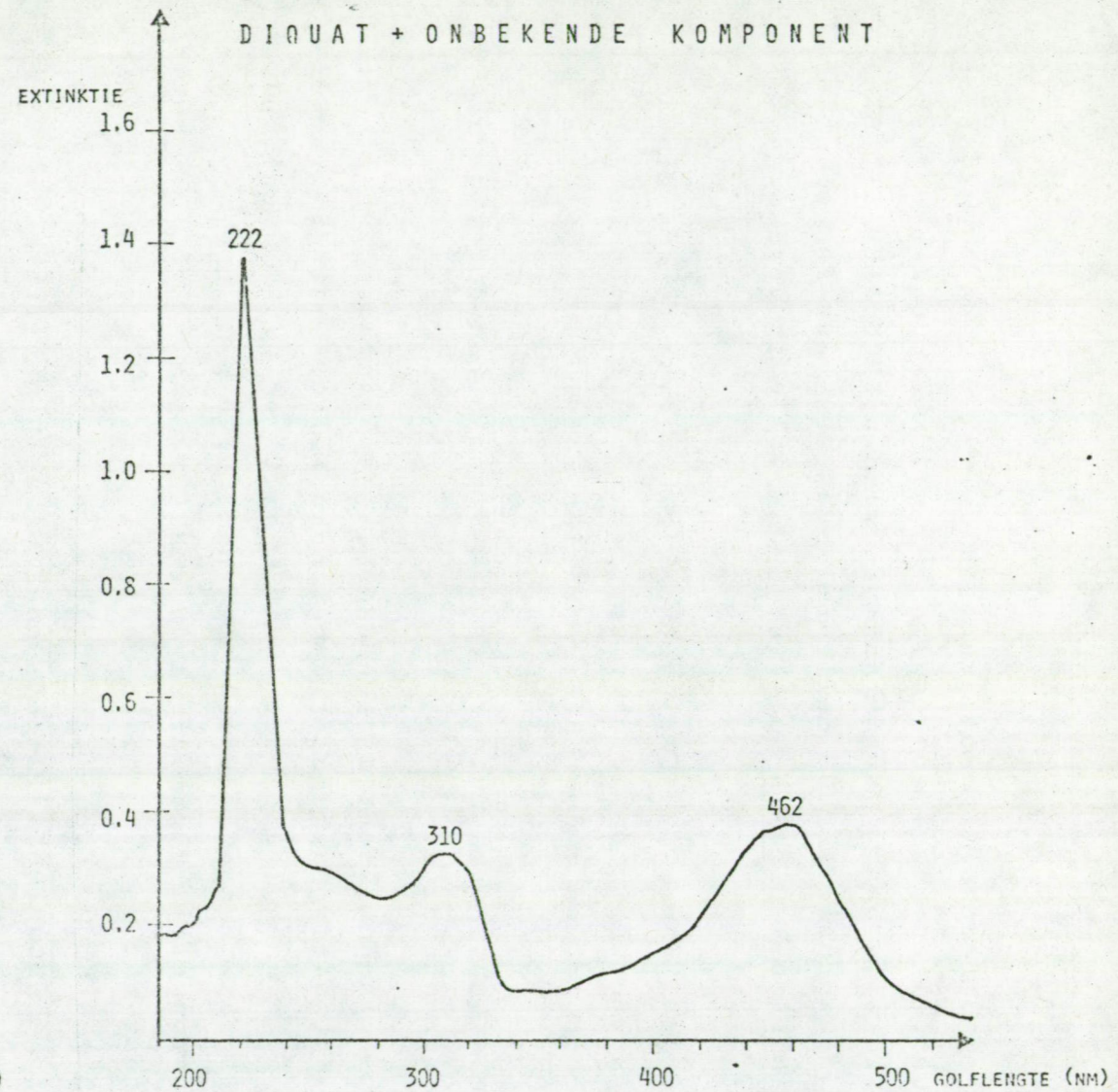
Na 24 uur was het niet meer mogelijk de diquatkoncentratie in de buizen te meten. Er werd immers vastgesteld dat tussen ongeveer 24 en 30 uur doorborreling zowel in de belichte als niet-belichte buizen de testoplossing verkleurde. Er werd een gele komponent gevormd met een adsorptiepiek bij 462 nm. Figuren 50 en 51 geven het adsorptiespektrum van het niet gereduceerde diquat weer, bestaande uit twee pieken, en van het niet gereduceerde diquat samen met de gele komponent.

7.3.3.3. Akkumulatie van paraquat

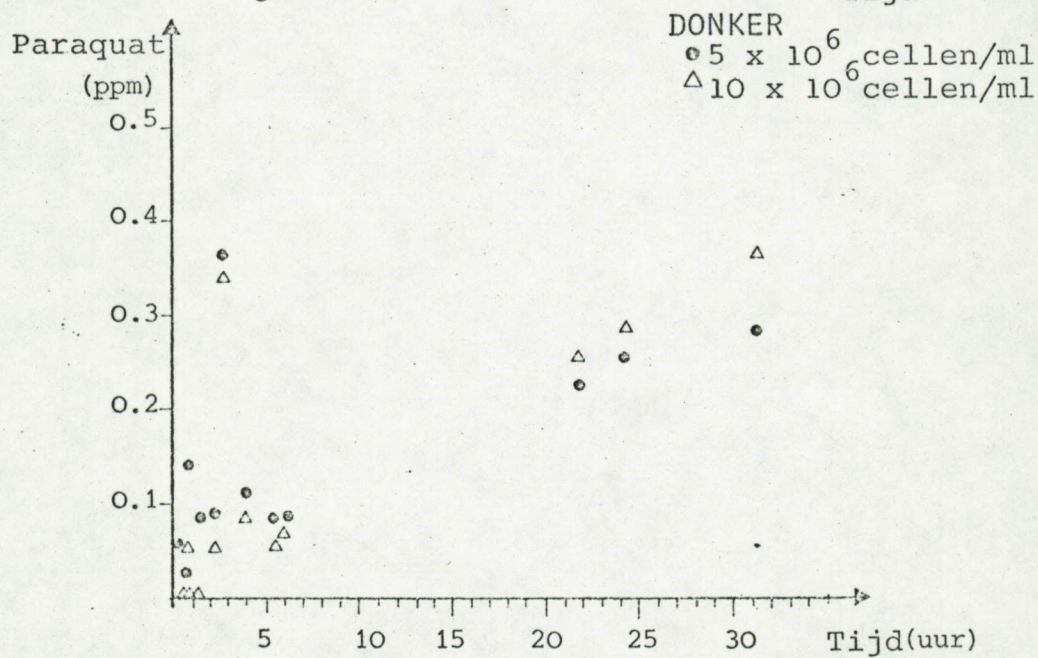
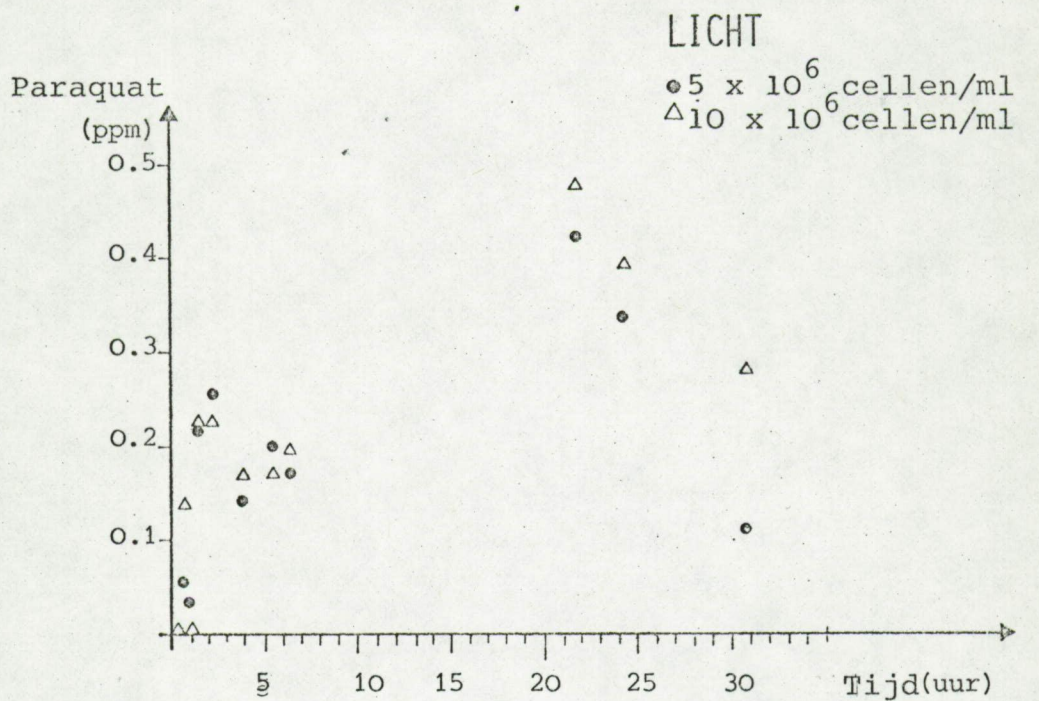
Figuur 52 geeft het verschil weer tussen de gemeten paraquatkoncentratie in het testmedium en in de blanco-opstelling.



Figuur 50 : Adsorptiespektrum van niet gereduceerd diquat.



Figuur 51 : Adsorptiespektrum van niet gereduceerd diquat met een onbekende gele component.



Figuur 52 : Akkumulatie van paraquat in/aan Scenedesmus opoliensis-cellen.
 A. in het licht
 B. in het donker
 Residu paraquat in 5×10^6 en 10×10^6 wier-
 cellen/ml i.f.v. de tijd.

Zoals voor diquat wordt de paraquat-adsorptie niet sterk beïnvloed door een verdubbeling van het aantal wiercellen in suspensie (5×10^6 of 10×10^6 cellen/ml).

De accumulatie van paraquat door Scenedesmus-cellen is in elk geval veel geringer dan deze van diquat.

Er valt moeilijk een onderscheid te maken tussen de accumulatie van paraquat door S. opoliensis-cellen in het licht en in het donker.

7.3.4. Bespreking van de resultaten

- Aan de hand van de uitgevoerde experimenten is het spijtig genoeg niet mogelijk uit te maken welk percentage herbicide aan de celwand van Scenedesmus wordt geadsorbeerd, en welk % eventueel doorheen de celwand wordt getransporteerd en dus door de wiercellen wordt geabsorbeerd. Een mogelijk argument om aan te nemen dat het bij diquat vooral om een adsorptieproces gaat eerder dan om een absorptie, is de snelheid van accumulatie en het feit dat deze snelle accumulatiefase wordt gevolgd door een plateaufase.

- De oorzaak van de grotere accumulatie van diquat bij Scenedesmus opoliensis in het donker dan in het licht, kon ook niet worden achterhaald.

Enerzijds is het mogelijk dat Scenedesmus preferentieel chemikaliën akkumuleert in het donker i.p.v. in het licht. Hiervoor verwijzen we naar de proeven van VALENTINE & BINGHAM (1974) die aantoonde dat Scenedesmus quadricauda meer 2,4-D adsorbeert in het donker dan in het licht. Waar het licht geen directe invloed heeft op de herbicide werking van 2,4-D, is dit wel duidelijk het geval met diquat (zie 4.1.2.)

Het is als dusdanig niet uitgesloten dat de hogere accumulatie van diquat in het donker verband houdt met de kleinere herbicide werking van dit produkt in het donker. Het valt echter op te merken dat in tegenstelling met het zeer snelle accumulatieproces, de herbicide werking van diquat zich niet onmiddellijk manifesteert.

STOKES et al. (1970) vonden dat ondanks het feit dat diquat reeds 60 minuten na de toepassing een inhibitie van de fotosyn-

tese veroorzaakte bij Chlorella, het nog 10 uur duurde vooral-
 eer er enige verandering in de structuur van de chloroplast
 (aktieplaats van het herbicide) kon worden waargenomen. Deze
 auteurs konkludeerden dat "if the early inhibition of photo-
 synthesis and respiration were caused by structural changes
 to organelles, this must occur at a level not resolvable by
 electron microscopy".

Indien in de eerste vijf uur na de toediening de akkumu-
 latie van diquat in Scenedesmus opoliensis-cellen gekorreleerd
 is met zijn herbicide werking, dan berust deze korrelatie bij-
 gevolg waarschijnlijk op een fysiologische verandering van de
 wiercellen.

- Paraquat akkumuleert minder in S. opoliensis-cellen dan di-
 quat. Uit landbouwexperimenten is gebleken dat paraquat en
 diquat in gelijke mate geadsorbeerd worden door sterk organisch
 beladen bodems, maar dat minerale bodems daarentegen preferen-
 tieel diquat adsorberen (GAMAR & MUSTAFA, 1975).

Het onderzoek van BEST et al. (1972) kan hiervoor een
 verklaring geven. Deze auteurs stelden namelijk vast dat men
 een onderscheid moet maken tussen flexibele en rigide substraten.
 De organisch beladen bodems behoren tot het eerste type
 en de minerale bodems tot het tweede. BEST et al. (op.cit.)
 bewezen dat diquat beter door rigide substraten wordt geadsor-
 beerd dan paraquat en dat dit te wijten is aan de kleinere af-
 stand tussen de ladingen van de molekulen (bij diquat bedraagt
 de afstand tussen de twee kwaternaire ammoniumkernen 35 nm en
 bij paraquat is dit 75 nm). "The adsorbent tends to favour
 the ion whose charge separation matches the charge distribu-
 tion in the matrix". Flexibele adsorbantia in tegenstelling
 met rigide, veranderen hun moleculaire configuratie waardoor
 de adsorptie van beide molekulen in even grote mate kan ge-
 beuren.

Naar analogie hiermee kunnen wij stellen dat, in de hypo-
 these dat het akkumulatieproces in hoofdzaak berust op een ad-
 sorptie, de celwand van Scenedesmus een rigide structuur is
 waaraan gemiddeld 30% van het aanwezige diquat en slechts 5%
 van het aanwezige paraquat worden geadsorbeerd.

7.3.5. Besluiten

Uit de literatuur en onze eigen bevindingen kunnen we besluiten dat :

- de dipyridylum-herbiciden paraquat en diquat snel en sterk worden geadsorbeerd aan de organisch geladen sedimenten. Het adsorptiemechanisme berust hoofdzakelijk op een directe elektrostatistische interacties van de herbicide-molekullen (positief geladen) en de negatieve polen van het substraat.
- aan starre structuren wordt preferentieel diquat geadsorbeerd omdat de afstand van de ladingen van de molekulen kleiner is dan in het paraquat. Flexibele substraten zoals humuszuren in organo-kleikomplexen passen hun moleculaire configuratie aan, aan de structuur van het adsorberende produkt.
- in die optiek kunnen we aannemen dat aangezien de celwand van Scenedesmus opoliensis een rigide structuur heeft, in de door ons gebruikte proefomstandigheden, maximaal 30% van het aanwezige diquat en 5% van het aanwezige paraquat wordt geadsorbeerd.
- het is mogelijk dat de herbicide werking en het adsorptievermogen van paraquat en diquat bij S. opoliensis gekorreleerd zijn : enerzijds is paraquat toxischer voor S. opoliensis dan diquat (zie 5.2.5.), maar wordt er minder door geadsorbeerd ; anderzijds is de herbicide werking van diquat in het donker te verwaarlozen t.o.v. in het licht, maar wordt het beter in het donker geadsorbeerd dan in het licht.

7.4. Akkumulatie van paraquat en diquat in vissen (Brachydanio rerio en Poecilia reticulata)

7.4.1. Metode

CALDERBANK, MORGAN & YUEN (1961) en CALDERBANK & YUEN (1965) stelden methoden op punt om paraquat- en diquat-residu's te bepalen in aardappelen, kruiden, dierlijke weefsels, enz... Het herbicide wordt eerst geëxtraheerd door 5 uur refluxen met een zuur (H_2SO_4 of HNO_3). Het extrakt wordt na neutralisatie over een kationenuitwisselaar gebracht, die het herbicide en ook sommige natuurlijke bestanddelen weer-

houdt. Het herbicide wordt dan geëluëerd met gesatureerd NH_4Cl . Een deel van het effluent wordt behandeld met alkalisch Na-dithioniet, waarna de extinktie van het gereduceerde, vrije paraquat of diquat-radikaal spektrofotometrisch gemeten wordt.

Het onderzoeksteam van ICI te Jealott's Hill Research Station, in Bracknell, England werkte deze methode verder uit en bepaalde de detectielimiet ; deze is voor paraquat en voor diquat gelegen tussen 0.01 en 0.1 ppm naargelang het staal (PPRAM-1 ; PPRAM-5).

SHARP, OTTOLENGHI & POSNER (1973) bepaalden de paraquatkoncentratie in verschillende organen van met paraquat behandelde (oraal en intraveneus) witte ratten. De weefsels werden gedestruëerd door homogeniseren met een ultra-mixer na toevoeging van 10 N H_2SO_4 . De concentratie aan paraquat werd kolorimetrisch bepaald na neutralisatie, centrifugatie en reductie met Na-dithioniet. De minimale hoeveelheid die op deze manier, zonder ionenuitwisselaar, kon gedetekteerd worden is 1 nmol paraquat/ml homogenaat (= 0.408 ppm).

De defekatie met trichloorazijnzuur zoals voorgescreven door ICI in TBM/3 (1968) en toegepast o.a. door MARTENS et al. (1975) wordt door SHARP et al. (op.cit.) afgeraden omdat de chromofoor onstabiel is in aanwezigheid van trichloorazijnzuur, zelfs indien het extrakt neutraal of basisch wordt gemaakt met NaOH, Na_2CO_3 of K_3PO_4 . De optische densiteit bij 395 en 605 nm daalt met 50% in minder dan 1 minuut.

De door ons gebruikte methode voor het kwantificeren van de hoeveelheid paraquat of diquat die door de testvissen werd geakkumuleerd is een combinatie van voornoemde analyse-technieken :

- apparatuur :

- analytische balans Mettler H35
- droogkast Heraeus
- Ultraturrax (20.000 rpm)
- Sorvall superspeed angle centrifuge (type SS-1)
- chromatografische kolom (1 cm diameter)
- spektrofotometer Zeiss PM QII met glazen mikrokuvetten van 1 cm "pathlength" en 0.25 ml inhoud

- reagentia

- 1 N H_2SO_4
- 10 N NaOH
- 3.5 g ionenuitwisselbare Permutit Zeo-Karb 225 (52-100 mesh) 8% DVB
- 2M en 6M HCL
- methanol
- sat. NH_4Cl
- 0.2% Na-dithioniet in 0.3 M NaOH (beperkte houdbaarheid, maximum 3 uur)
- paraquat-dichloride 100.0% ICI
- diquat-dibromide-monohydraat 100.0% ICI

- Werkwijze :

- Voorbehandeling van de ionenuitwisselaar : alvorens het over te brengen in een chromatografische kolom werd het hars gewassen met gedistilleerd water. Nadien werd de gevulde kolom gewassen met 20 ml 6M HCl (5 ml/min.) tot het eluaat kleurloos was. De kolom werd aldus gezuiverd van HCl-oplosbare onzuiverheden, en werd in de bruikbare zure vorm omgezet. Nadien werd de kolom gespoeld met 50 ml ad.dest. (5 ml/min.) (MARTENS & HEYNDRIX, 1974).

- De vissen werden aan beide kanten afgedroogd, waarna het natgewicht werd bepaald. Enkele "blanko"-vissen werden op dezelfde wijze behandeld en werden vervolgens minstens 48 uur gedroogd bij 40°C tot konstant gewicht. Na afkoeling in desikator werd het drooggewicht bepaald.

- Stalen van gemiddeld 3 vissen werden gedurende 1 minuut met 7 ml 1 N H_2SO_4 in een wijde centrifugebuis gehomogeniseerd met Ultraturrax. Het extrakt werd geneutraliseerd met 1 ml 10 N NaOH (SHARP et al., op.cit.).

- Het extrakt werd gedurende 15 minuten gecentrifugeerd in een Sorvall centrifuge (1500 g = 3400 rpm) en de bovenstaande vloeistof overgebracht in een erlenmeyer.

- Het residu werd opnieuw met 7 ml 1N H_2SO_4 gehomogeniseerd en gecentrifugeerd. De bovenstaande vloeistof werd aan de eerste hoeveelheid toegevoegd.

- De stalen werden door de kolom gestuurd a rato van 5 ml/min. (PPRAM-1 en -5).

- De kolom werd gespoeld met 10 ml 2M HCl (5 ml/min.) en daarna geëluëerd met 10 ml 6M HCl (1 ml/min.).

Het eluaat werd drooggedampt bij 160°C onder vakuum (MARTENS & HEYNDRICKX, op.cit.).

- Het droge residu werd opgelost in methanol (MARTENS & HEYNDRICKX, op.cit.) en overgebracht in kleine glazen proefbuisjes van 4 ml. De methanol werd vervolgens onder vakuum bij 40°C verdampt.

- Het droge extrakt werd opgelost in 0.5 ml gesatureerd NH_4Cl waaraan 0.5 ml Na-dithioniet in 0.3M NaOH werd toegevoegd (PPRAM-1 en -5).

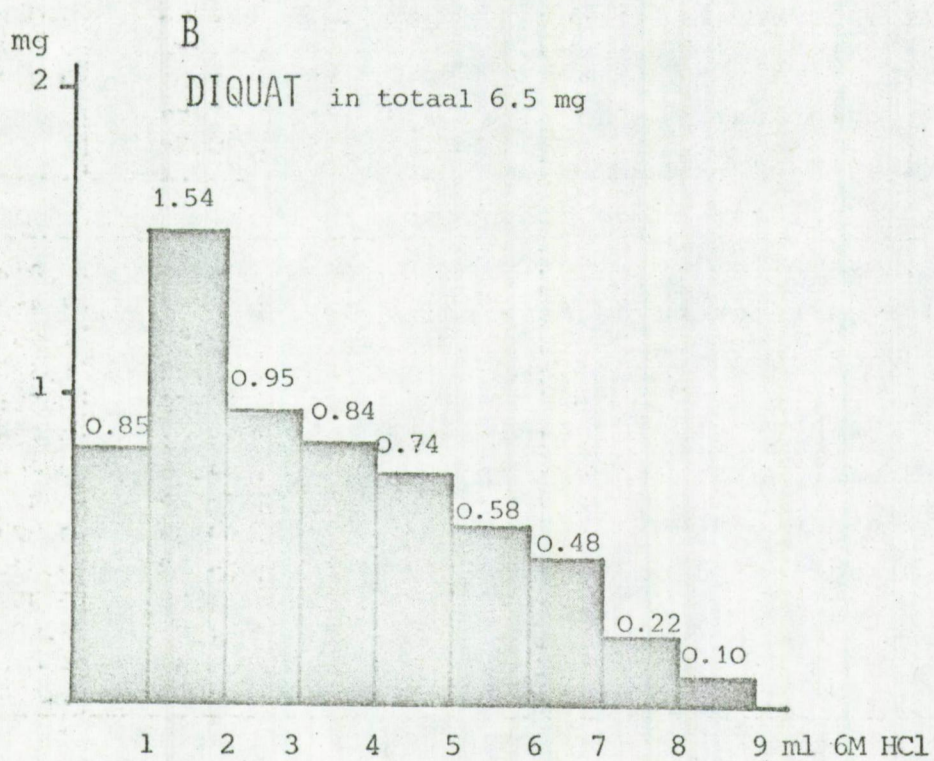
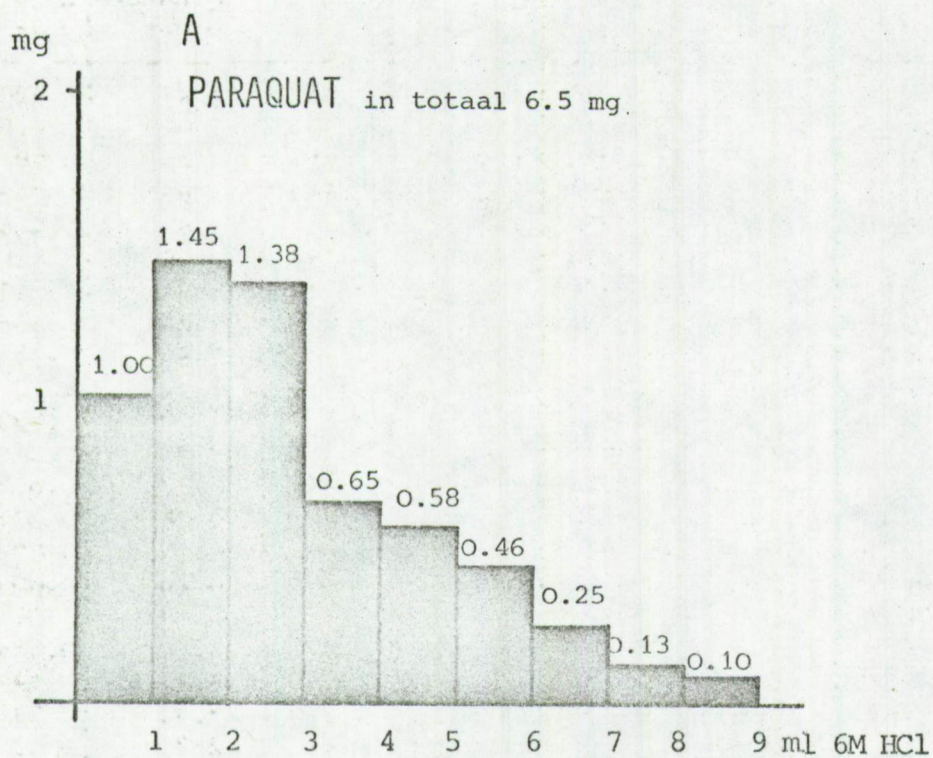
- De extinktie werd gemeten bij 392, 396, 400 en 401 nm voor paraquat (PPRAM-1) en bij 375, 379, 383 en 385 nm voor diquat (PPRAM-5).

7.4.2. Materiaal

Aan de hand van de hoger beschreven methode werd het residu paraquat of diquat bepaald in vissen gebruikt in de bioassays voor het bepalen van de TL_{50} -waarden na 24, 48, 72 en 96 uur. De vissen verzameld na proeftijden korter dan 96 uur (de totale duur van de bioassay) waren alle dode vissen. De testakwaria werden om het uur gecontroleerd met uitzondering van 's nachts, en de dode vissen werden steeds onmiddellijk uit het medium verwijderd. In elk geval werden de vissen die enig teken van ontbinding begonnen te vertonen niet gebruikt voor de analyses.

De hoeveelheid paraquat werd bepaald in 27 verschillende reeksen, met in totaal 77 Brachydanio rerio. De paraquat-koncentratie van 12 stalen met 37 guppies werd eveneens bepaald alsook het diquat-residu in 9 stalen met 26 Poecilia reticulata.

Twee stalen voor paraquat werden eveneens door apotheker M. MARTENS gaschromatografisch geanalyseerd, gebruik makend van een massa-spektrograaf als detektiebron, volgens de methode beschreven in MARTENS et al. (op.cit.). De resultaten hiervan zijn in de tabellen en figuren aangeduid met M.



Figuur 53 : Rendement van de ionenuitwisselaar en van de elutie met 6M HCl.

A: van paraquat

B: van diquat

Brachydanio rerio paraquat									
ppm paraquat	uur	aantal vis-sen	extinktie in 0.5 ml NH ₄ Cl	koncentratie in NH ₄ Cl	totaal natgewicht in g	totaal drooggewicht in g	µg paraquat per vis	µg paraquat per g natgewicht	akkumulatiesnelheid ug/g/uur
10	3	3	0.125	1.96	0.6679	0.2048	0.33	1.47	0.4900
10	3	2	0.127	1.98	0.5343	0.1638	0.50	1.85	0.6166
10	24	2	0.104	1.63	0.3900	0.1195	0.41	2.09	0.0871
10	24	3	0.161	2.52	0.7683	0.2355	0.42	1.64	0.0683
32	3	3	0.107	1.68	0.5906	0.1810	0.28	1.42	0.4733
32	3	3	0.144	2.25	0.7111	0.2180	0.38	1.58	0.5267
32	3	3	0.207	3.23	0.8766	0.2687	0.54	1.84	0.6133
32	24	1	0.077	1.20	0.2537	0.0778	0.60	2.36	0.0983
56	3	3	0.173	2.70	0.9244	0.2833	0.45	1.46	0.4867
56	3	3	0.184	2.88	0.9529	0.2921	0.48	1.51	0.5033
56	3	3	0.197	3.07	0.8584	0.2631	0.51	1.79	0.5967
5.6	72	3	0.041	0.64	0.7943	0.2435	0.11	0.40	0.0056
5.6	72	3	0.103	1.60	0.9218	0.2825	0.27	0.87	0.0120
5.6	72	3	0.032	0.51	0.9158	0.2807	0.09	0.28	0.0039
3.2	72	3	0.022	0.35	1.0180	0.3120	0.06	0.17	0.0023
3.2	72	3	0.029	0.46	0.8900	0.2817	0.08	0.26	0.0036
3.2	72	3	0.023	0.37	0.7790	0.2388	0.06	0.24	0.0031
56	24	3	0.323	5.04	0.6807	0.2084	0.84	3.70	0.1542
56	24	3	0.337	5.25	0.7703	0.2361	0.88	3.41	0.1421
32	72	3	0.256	3.99	0.5998	0.1838	0.67	3.33	0.0463
32	72	3	0.184	2.88	0.6123	0.1838	0.48	2.35	0.0326
32	72	3	0.187	2.92	0.6170	0.1891	0.49	2.37	0.0392
18	72	3	0.191	2.98	0.6954	0.2131	0.50	2.14	0.0297
18	72	3	0.073	1.13	0.6863	0.2104	0.19	0.82	0.0114
18	72	3	0.101	1.57	0.7790	0.2388	0.26	1.01	0.0140
B1	96	3	0.086	1.34	0.7950	0.2437	0.22	0.84	
B1	96	3	0.055	0.86	0.7950	0.2437	0.14	0.54	
Poecilia reticulata paraquat									
10	24	5	1.088(x2)	11.19	0.2862	0.0589	1.12	19.55	0.8146
100	24	5	2.844(x4)	26.64	0.2262	0.0466	5.89	58.88	2.4533
56	24	8	0.956	8.95	0.1127	0.0232	2.48	39.69	1.6537
56	48	2	0.592	5.55	0.0435	0.0090	15.95	63.79	1.3289
32	48	2	0.328	3.07	0.0491	0.0101	7.82	31.26	0.6513
32	72	2	0.492	4.61	0.0435	0.0090	13.25	53.01	0.7363
32	96	5	1.470(x2)	13.97	0.1541	0.0317	4.47	44.63	0.4649
18	72	3	0.244	2.29	0.0380	0.0078	5.01	30.08	0.4178
56	72	2	0.574	5.37	0.0452	0.0093	14.84	59.35	0.8243
3.2	72	1	0.313	3.60	0.0734	0.0151	1.80	24.52	0.3406
3.2	72	1	M	3.70			1.85	25.52	0.3544
1000	24	2	9.107(x10)	85.30	0.0453	0.0093	213.3	941.5	3.9229
1000	24	2	M	87.60			219.0	966.9	4.0287

TABEL 40 : Akkumulatie van paraquat en diguat in de vissen Brachydanio rerio en Poecilia reticulata.

M: stalen die werden geanalyseerd door MARTENS

TABEL 40 : vervolg

<div> <div>Poecilia reticulata</div> <div>diquat</div> </div>									
ppm di- quat	uur	aan- tal vis- sen	extinktie in 0.5 ml NH ₄ Cl	koncentra- tie in NH ₄ Cl	totaal natge- wicht in g	totaal droog- gewicht in g	ug di- quat per vis	ug di- quat per g natge- wicht	akkumula- tiesnel- heid ug/g/uur
1000	24	1	1.268	11.88	0.0646	0.0133	5.95	183.9	7.6625
100	24	2	0.388	3.64	0.0972	0.0200	0.91	18.72	0.7800
56	24	5	0.800	7.50	0.2984	0.0614	0.75	12.60	0.5251
56	48	1	0.134	1.26	0.0424	0.0087	0.63	14.82	0.3088
56	96	1	0.143	1.34	0.0353	0.0073	0.67	18.89	0.1967
32	48	3	0.378	3.54	0.1591	0.0328	0.59	11.04	0.2300
18	72	4	0.487	4.56	0.2058	0.0424	0.57	11.14	0.1551
18	96	5	0.747	7.00	0.2690	0.0554	0.71	13.11	0.1366
10	72	3	0.096	0.90	0.1557	0.0321	0.15	2.95	0.0409
10	96	3	0.057	0.54	0.1168	0.0240	0.09	2.20	0.0229

7.4.3. Resultaten

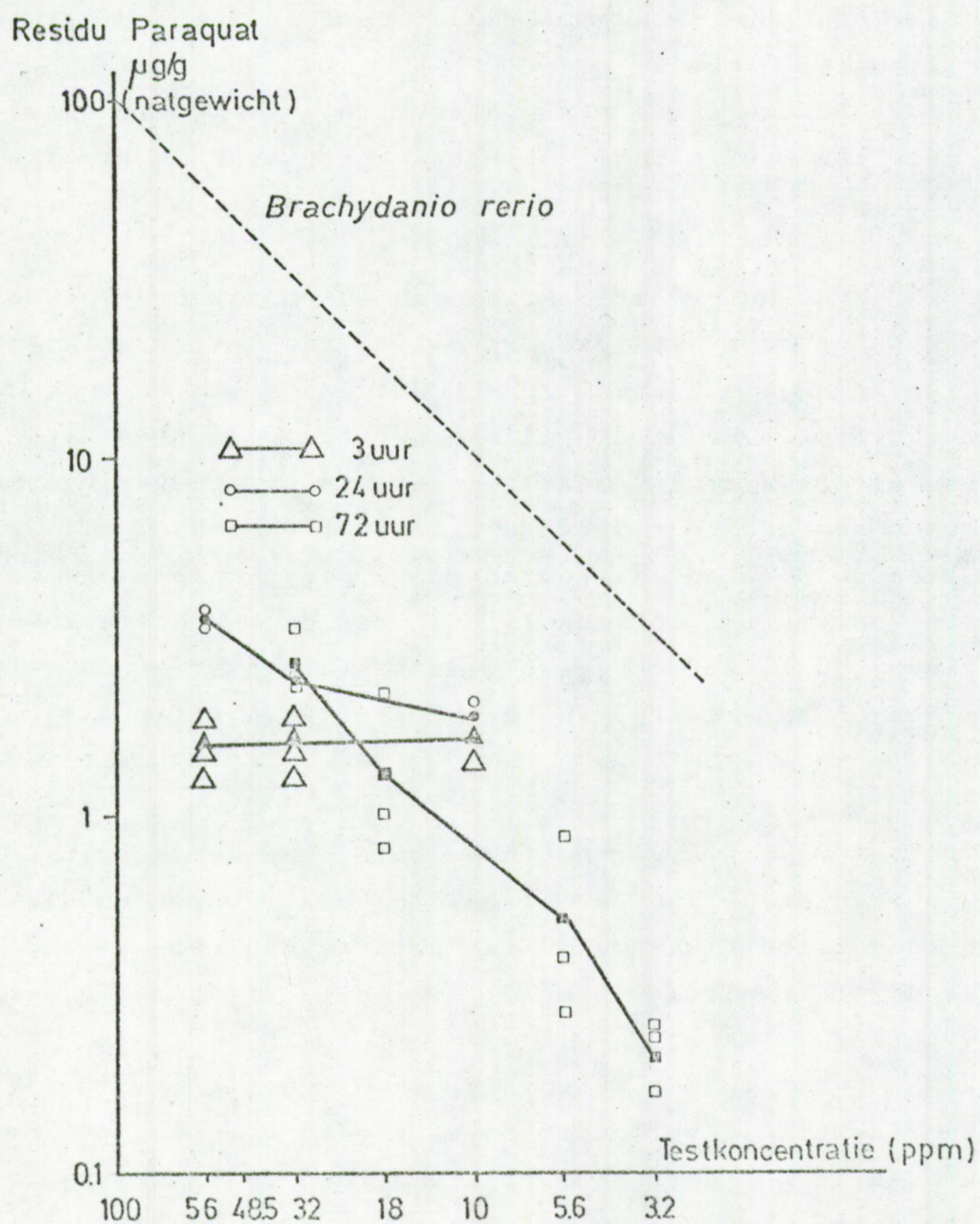
Het rendement van de ionenuitwisselaar en van de elutie met 6M HCl werd bepaald aan de hand van een staal van 15 ml 0.5 ppm analytisch paraquat of diquat. De proef werd tweemaal herhaald. Figuur 53 geeft de gemiddelde waarden voor beide produkten weer. Voor paraquat werd 92.2% van de oorspronkelijke hoeveelheid teruggevonden, voor diquat 98.5%.

Het residu en de kenmerken van elk staal wat betreft de testkoncentratie, de testduur, de testsoort en het aantal specimens zijn weergegeven in Tabel 40. Het residu herbicide werd uitgedrukt in μg per g natgewicht vis. Deze resultaten werden, behalve in Tabel 40, ook weergegeven in Figuren 54, 56 en 57.

Om de partitionering van een toxikant te beoordelen kan men het best het inwendig milieu van het organisme als de voortzetting beschouwen van het uitwendig milieu waarin het zich bevindt. De dichtheid van het testmilieu en van het totale testorganisme verschilt zeker slechts in geringe mate (vissen bestaan voor 75.6% uit water (ISENSEE et al., 1973)). Het residu toxikans uitgedruk in μg per g natgewicht van het testorganisme is, in vergelijking met de concentratie van het milieu in mg/liter, bijgevolg de beste manier om de verdeling van één of andere stof in het biologisch systeem uit te drukken.

Op basis van het natgewicht van de testvissen, werd er in Figuren 54, 56 en 57 een diagonaal getrokken die alle punten weergeeft waarvoor concentratie van het uitwendig en inwendig (uitgedrukt in mg/l) milieu (uitgedrukt in $\mu\text{g/g}$ natgewicht) gelijk zijn.

Uit deze figuren kan men bijgevolg onmiddellijk aflezen in welke gevallen er in de proefdieren hogere concentraties dan in het omringend milieu werden waargenomen. De richtingscoëfficiënt van de rechten die het akkumulatieproces weergeven, in vgl. met de richtingscoëfficiënt van deze diagonaal leert ons of het proces sneller of trager verloopt dan een diffusieproces in ideale omstandigheden, waarbij in- en uitwendig milieu ekwivalent zijn.



Figuur 54 : Akkumulatie van paraquat in Brachydanio rerio:
Residu (µg paraquat ion/g natgewicht vis)
i.f.v. de testkoncentratie.

In de 3 figuren werden ook de TL_{50} -waarden voor de betrokken vissoort na 24 uur, 48, 72 en 96 uur aangeduid. De residubepalingen van paraquat in B. rerio zijn praktisch alle gebeurd op proefdieren die geëxposeerd werden aan testkoncentraties lager dan de TL_{50}^{96} -waarde. Voor P. reticulata werden de residus van paraquat en diquat bepaald op vissen geëxposeerd aan herbicide-koncentraties zowel boven als onder de TL_{50}^{24-96} -waarden.

7.4.4. Akkumulatie van paraquat in B. rerio

Beschouwen we vooreerst de resultaten met Brachydanio rerio en paraquat (Figuur 54, Tabel 40).

Uit Figuur 54 blijkt dat in geen geval de diagonaal van gelijke in- en uitwendige concentratie wordt benaderd of, met andere woorden, dat er voor deze vissoort nergens een zgn. "biological magnification" weer te vinden is.

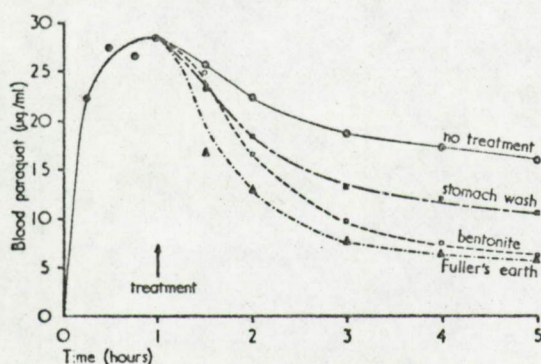
De Brachydanio's bevatten, na 3 uur blootgesteld te zijn aan testkoncentraties gelegen tussen 10 en 56 ppm paraquat, éézelfde hoeveelheid residu, nl. circa 1.5 $\mu\text{g/g}$ vis. Na 24 uur blijkt deze hoeveelheid te stijgen, en wel evenredig met de concentratie in de testoplossingen. Na 72 uur echter blijkt, bij concentraties lager dan 32 ppm paraquat een desorptie op te treden, zodat de hoeveelheid residu lager en lager wordt bij dalende testkoncentraties; bij 3.2 ppm paraquat werd na 72 uur gemiddeld slechts 0.2 $\mu\text{g/g}$ herbicide teruggevonden.

Het akkumulerend verschijnsel is bijgevolg reversibel. De hypothese dat het produkt zou afgebroken worden is weinig waarschijnlijk in het geval van paraquat (zie 4.1.6.).

Het residu blijkt dus niet evenredig te stijgen met de testduur, maar integendeel een hoogste waarde te vertonen bij 24 uur. Bij gebrek aan meer uitgebreide proeven kan men niet uitmaken of deze waarde de piekwaarde is of dat er in de eerste uren van de test nog hogere concentraties werden geakkumuleerd.

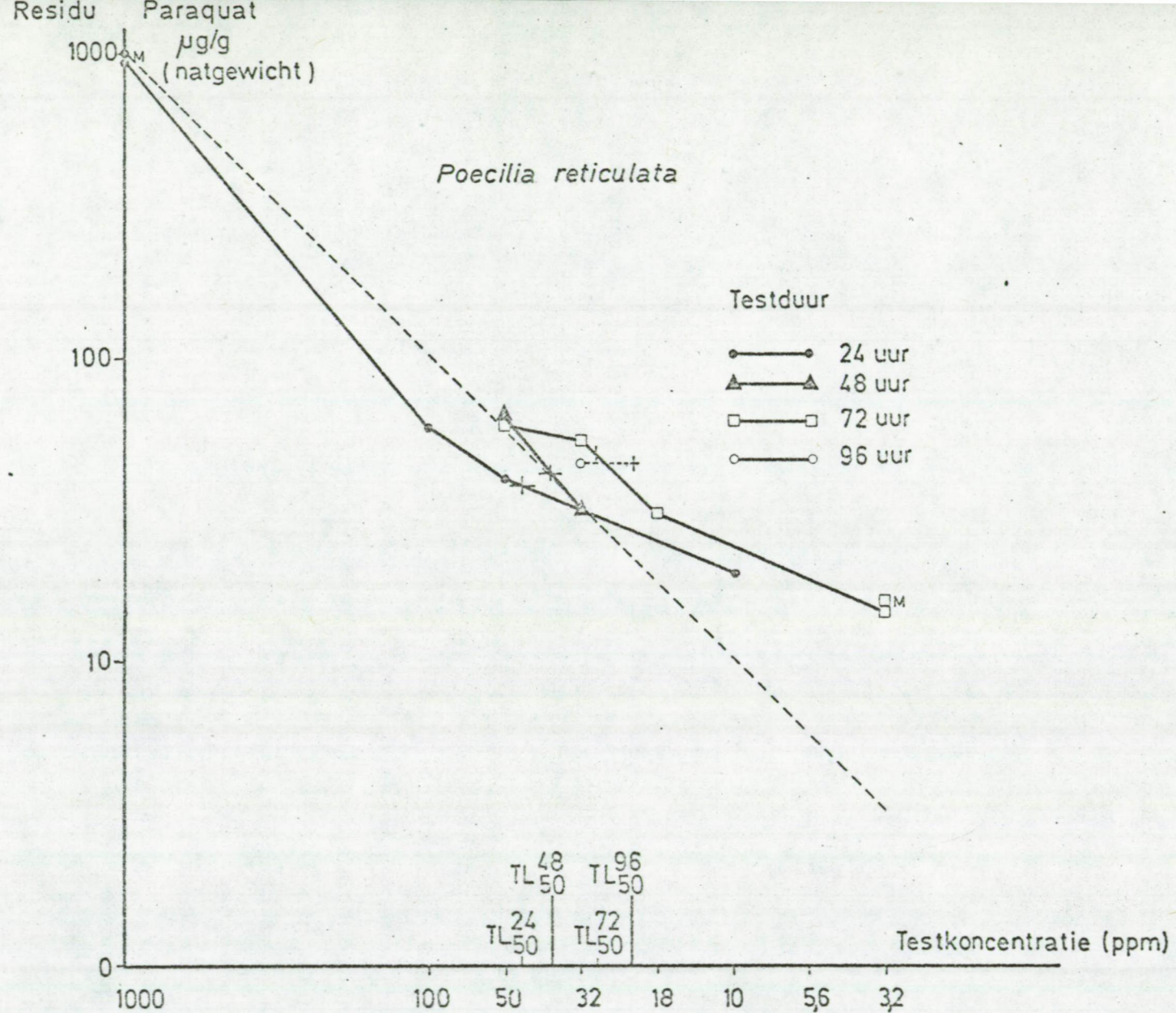
Piekkoncentraties in het organisme (in verscheidene lichaamsvochten or organen) korte tijd na het toedienen van

een stof, zijn in de farmaceutische toxicologie een typisch verschijnsel. De experimenten van CLARK (1971), tonen een piekkoncentratie paraquat aan in het bloed van katten, 1 uur na de behandeling met 300 mg/kg (of 300 ppm) paraquat. Daarna daalt het gehalte geleidelijk (Figuur 55). Toedienen van adsorberende stoffen zoals Fuller's aarde en bentoniet versnelt deze eliminatie.



Figuur 55 : Paraquat-koncentratie in het bloed van katten na een orale dosis paraquat van 62.5 mg/kg. Het effect van 3 verschillende behandelingen op de paraquat-koncentraties in het bloed (naar CLARK, 1971).

In het geval van aquatische organismen is het duidelijk dat de behandeling niet op een bepaald tijdstip gebeurt gezien de organismen continu in het toxisch milieu verblijven. Een piekkoncentratie in het organisme enkele uren na de start van de proef treedt echter eveneens op. De curve van de gevonden concentraties in functie van de tijd is een typische adsorptiecurve. Dit wil zeggen dat er korte tijd na de start een piekkoncentratie waar te nemen is met daarna een fase van desorptie (KENAGA, 1975). Indien er zoals in het geval van de proeven van CLARK (op.cit.) geen nieuwe dosis toxikans wordt toegediend, blijft deze desorptie duren, terwijl in het geval van aquatische organismen na de desorptiefase opnieuw een accumulatiefase kan optreden. Deze fase is gekenmerkt door ad- of absorptie, maar in elk geval door een proces verschillend van de primaire adsorptie wat betreft het ritme of de plaats waaraan het testprodukt geadsorbeerd wordt.



Figuur 56 : Akkumulatie van paraquat in *Poecilia reticulata*:
Residu (μg paraquat ion/g natgewicht vis) i.f.v. de test-
koncentratie.

KENAGA (1975), onderscheidt twee fasen in de residu-vorming :

- 1) de fysische adsorptie aan oppervlakten, een proces dat vrijwel dadelijk optreedt en o.m. bepaald wordt door de verhouding oppervlakte/volume van het organisme ;
- 2) een "long term"-penetratie in het organisme of absorptie. Een kontinu verhoging van het residu i.f.v. de tijd is bijgevolg te wijten aan een absorptie, gepaard aan een redistributie binnenin het organisme.

De geadsorbeerde fraktie kan men eerder als een basis-residu beschouwen omdat uiteraard deze fraktie vlugger een plateaufase bereikt.

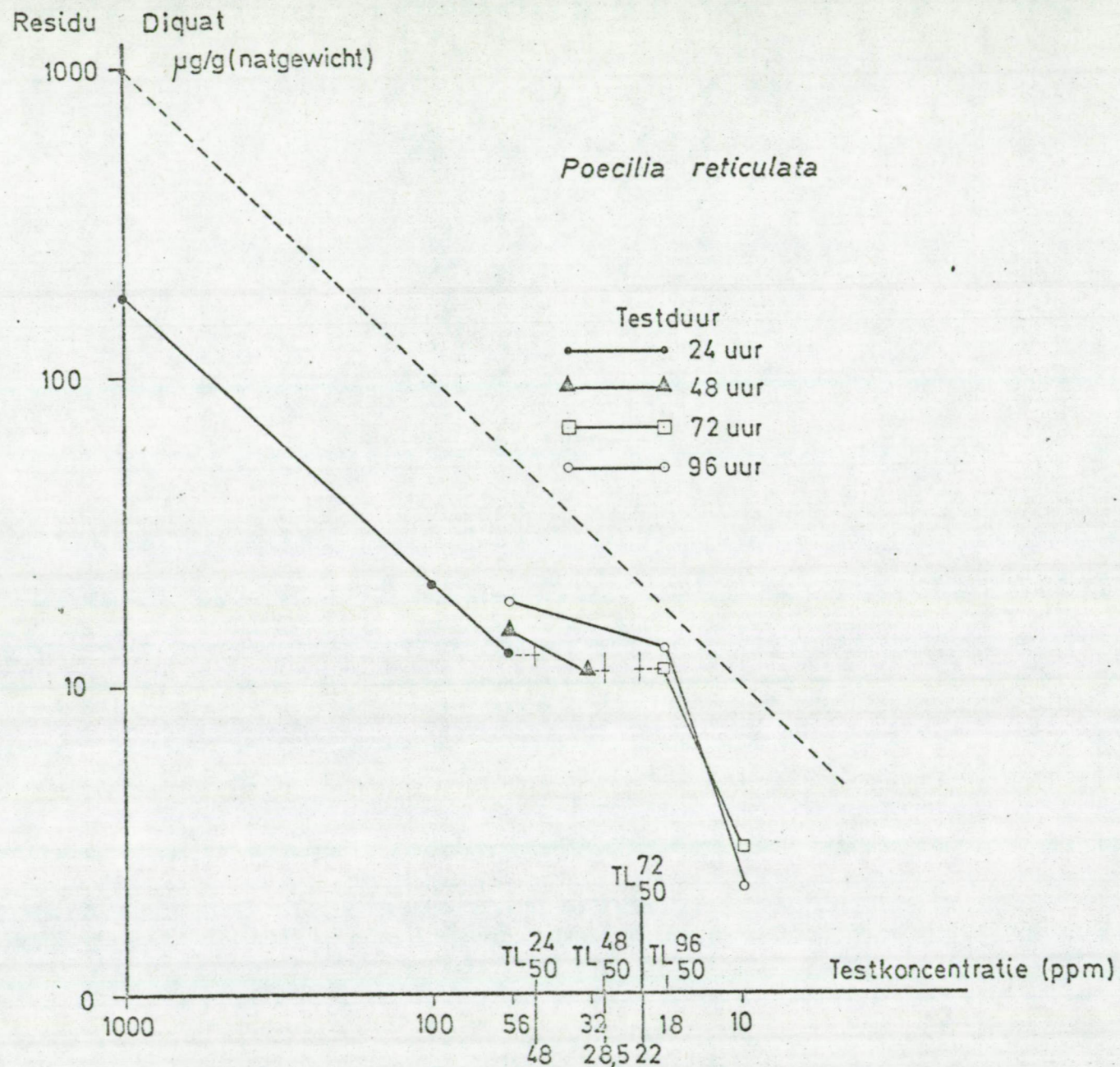
Een desorptie van het geakkumuleerde materiaal (terwijl het testorganisme zich nog in de testoplossing bevindt) is volgens BRANSON et al. (1975) zeer uitzonderlijk tenzij het niet om een biokoncentratie gaat maar eerder om een fysisch proces, zoals bv. adsorptie.

In onze proeven kunnen de vrijwel identieke residu's na 3 uur in 56, 32 en 18 ppm paraquat en na 24 uur in 32 en 18 ppm dus het basis-residu vertegenwoordigen, dat echter aan een belangrijke desorptie onderhevig is.

De lijn die de accumulatie na 72 uur i.f.v. de testkoncentratie weergeeft, heeft een gemiddelde richtingscoëfficiënt vrijwel gelijk aan deze van de diagonaal die de gelijke in- en uitwendige concentraties aanduidt, d.w.z. dat na een test van 72 uur het residu i.f.v. de testkoncentratie vermeerderd, op dezelfde manier als in het geval van een ideale diffusie. Alleen wordt voor alle uitgeteste concentraties paraquat slechts 10% opgenomen van de concentratie van het omringend milieu.

7.4.5. Akkumulatie van paraquat in *P. reticulata*

Uit Figuur 56 en Tabel 40 valt onmiddellijk op dat het vermogen van *Poecilia reticulata* om paraquat te accumuleren veel groter is dan dat van *Brachydanio rerio*. Bij een testoplossing van 32 ppm paraquat bedraagt dit ongeveer 10 maal en bij een testoplossing van 3.2 ppm paraquat ongeveer 100 maal meer.



Figuur 57 : Akkumulatie van diquat ion in *Poecilia reticulata*:
 Residu (μg diquat ion/g natgewicht vis) i.f.v. de testconcentratie.

De grootte van het teruggevonden residu verandert weinig in functie van de testduur, in tegenstelling met de zojuist besproken resultaten bij B. rerio. Rekening houdend met het feit dat er voor P. reticulata geen waarnemingen zijn na 3 u, kan men toch veronderstellen dat na 24 uur reeds het merendeel van het residu werd geakkumuleerd in zijn definitieve vorm (dus zonder desorptie achteraf) en na 72 uur een evenwicht werd bereikt. Globaal bekeken vertoont de geëxtrapoleerde akkumulatielijn in functie van stijgende testkoncentraties aan paraquat een buigpunt t.h.v. de concentraties overeenkomstig met de TL_{50} -waarden na 24 tot 96 uur.

De akkumulatie in concentraties hoger dan de TL_{50} -waarden volgt gelijke tred met de diagonaal van de ideale diffusie en benadert zelfs de waarden van deze diagonaal.

In het gebied van de concentraties lager dan de TL_{50} -waarden beschikken wij over gegevens voor 24 u en 72 u expositie. De verschillen in functie van de testduur zijn klein. Paraquat wordt in concentraties lager dan 32 ppm specifiek geakkumuleerd, zelfs tot 5x de concentratie van het uitwendig milieu (bij 3.2 ppm). Deze stalen zijn de enige van alle onderzochte stalen, waarin de inwendige concentratie paraquat de uitwendige concentratie overtreft en waar bijgevolg een duidelijke biokoncentratie wordt waargenomen. In functie van stijgende testkoncentraties neemt dit proces in belang af tot in het gebied van de TL_{50} -concentraties.

7.4.6. Akkumulatie van diquat in P. reticulata

Ook voor diquat volgt de akkumulatie in concentraties hoger dan de TL_{50} -waarden gelijke tred met de diagonaal van de ideale diffusie, doch ditmaal wordt ongeveer 5x minder opgenomen.

De gegevens over de akkumulatie in het gebied lager dan TL_{50} -waarden beperken zich tot de concentraties 18 en 10 ppm. Bij de hoogste van deze 2 testkoncentraties wordt relatief meer diquat geakkumuleerd dan bij de laagste. Dit verschil in residu na een even lange expositie in 10 en in 18 ppm diquat, is veel groter dan zou kunnen te wijten zijn aan een

ideaal diffusieproces doorheen het organisme ; de richtingskoëfficiënt van de rechten die het gehalte in 10 en 18 ppm met elkaar verbinden, is veel groter dan de richtingskoëfficiënt van de diagonaal die overeenkomt met gelijke in- en uitwendige concentraties (= ideale diffusie). Zowel een fysisch proces als een biokoncentratie kunnen hiervoor verantwoordelijk zijn.

Een accumulatie uitsluitend aan adsorptie te wijten is onwaarschijnlijk omdat mag aangenomen worden dat zowel na 72 u als na 96 u, gezien de snelheid van het adsorptieproces, de maximale hoeveelheid diquat die kan geadsorbeerd worden, reeds lang werd bereikt. In zo'n geval zou men een plateau-residu moeten terugvinden onafhankelijk van de testconcentratie (cfr. de proef met B. rerio en paraquat).

Bij een lange testtijd als deze is het natuurlijk mogelijk dat het primaire geadsorbeerde residu opnieuw werd gedesorbeerd en dat deze desorptie werd gevolgd door een secundaire accumulatie. Doch het is weinig waarschijnlijk dat deze sekundaire accumulatie in het geval van diquat een adsorptieverschijnsel is, vermits het residu relatief meer toeneemt dan de testconcentratie (de faktor oppervlakte van de vis blijft immers konstant).

Alles wijst in de richting van een actieve biokoncentratie die in tegenstelling met de resultaten voor paraquat met P. reticulata, in belang toeneemt met stijgende concentratie van het omringend milieu.

7.4.7. Samenvatting

- Brachydanio rerio hoopt slechts in zeer geringe mate paraquat op. Onze resultaten wijzen er tevens op dat er vanaf 24 u een zekere desorptie van het geakkumuleerde materiaal optreedt. Dit verschijnsel is in vergelijking met andere literatuurgegevens niet zo uitzonderlijk op voorwaarde dat de accumulatie op een fysisch proces steunt (zoals bv. adsorptie).

Na 72 u zijn de in- en uitwendige paraquat-koncentraties vrijwel recht evenredig waarbij ongeveer 10% van de concentratie aan paraquat van het omgevend milieu wordt geakkumuleerd.

- Poecilia reticulata hoopt 10 tot 100x meer paraquat op dan Brachydanio rerio in dezelfde omstandigheden. Daarbij konden we geen piekwaarde in het residu waarnemen zoals bij deze laatste vissoort wel het geval was. We veronderstellen dat na 24 u expositie reeds het merendeel van het residu in zijn definitieve vorm (zonder desorptie) werd geakkumuleerd. In concentraties paraquat lager dan 32 kan men bij P. reticulata een duidelijke biokoncentratie waarnemen. De inwendige concentratie overtreft tot 5x de uitwendige concentratie.
- Poecilia reticulata akkumuleert gemiddelde ongeveer 5 maal minder diquat dan paraquat.
We hebben argumenten om aan te nemen dat er in concentraties van 10 en 18 ppm een biokoncentratie optreedt die echter in wezen totaal verschillend is van de biokoncentratie waargenomen in de proeven met paraquat met hetzelfde organisme : het paraquat-residu neemt minder snel toe dan de testkoncentratie, het diquat-residu daarentegen neemt meer toe dan de testkoncentratie.

8. SAMENVATTING VAN DE RESULTATEN EN ALGEMENE BESPREKING.

I. In het onderzoek naar de "dosis-effekt"-relatie voor de drie uitgeteste herbiciden diquat, paraquat en 2,4-D en de twee detergenten ethomeen S25 en lissapol NX, werden vertegenwoordigers van diverse trappen van de aquatische voedselketen als testobject gebruikt. De testspecies werden gekozen in functie van het lokaal belang van de soort, de representativiteit voor de groep, en de beschikbaarheid van voldoende aantallen of van bepaalde levensstadia :

A. De groenwieren Scenedesmus opoliensis en Chlamydomonas reinhardi

- De routinekweek van beide wiersoorten en de bioassay-technologie werden gestandaardiseerd. Hiertoe werd onder meer een vergelijking gemaakt tussen de beschikbare literatuurgegevens en de eigen resultaten in verband met de keuze van een geschikt artificieel voedingsmedium.
- In de statistische bioassays met wieren werd enerzijds, zoals dit meestal gedaan wordt, de bereikte wierkoncentratie na een aantal dagen groei als criterium gebruikt. Anderzijds werden ook de groeifazen als dusdanig in aanmerking genomen voor het bepalen van het effect van de toxikanten op de wiersuspensies. Dit gebeurde door het berekenen van de integraal van de groeikurven en door de ED_{50} -waarden (effect-dosis voor 50% van de organismen) te berekenen parallel, aan de hand van deze integraalwaarden en aan de hand van de eindconcentratie in de wiersuspensies.

Uit de resultaten met de 6 uitgeteste produkten (paraquat met en zonder uitvloeier, diquat, 2,4-D, ethomeen S25 en lissapol NX) kunnen we volgende besluiten afleiden :

- 1) Beide methoden voor het berekenen van de ED_{50} -waarden geven voor alle zes de produkten zeer analoge resultaten (op 1 uitzondering na : C. reinhardi met 2,4-D). Hieruit volgt dat al deze produkten de globale wiergroei inhiberen en niet specifiek inwerken op één of andere fase uit de wiergroei.

- 2) Chlamydomonas reinhardi is een wiersoort die 2.5x gevoeliger is dan Scenedesmus opoliensis voor herbiciden (de resultaten met de detergenten liggen in dezelfde grootte-orde).

- 3) De volgorde van hoge naar geringe toxiciteit is voor de twee wiersoorten :

C. reinhardi

PZU \approx diquat \approx PMU > ethomeen S25 \gg lissapol NX \gg 2,4-D

S. opoliensis

PZU > PMU > diquat > ethomeen S25 \gg lissapol NX \gg 2,4-D

Voor C. reinhardi zijn de drie produkten paraquat met en zonder uitvloeiers^{en} diquat efficiënte herbiciden (50% groei-vermindering bij \pm 100 ppb). De groei van S. opoliensis wordt door deze produkten eveneens sterk bestreden (50% groeivermindering bij respektievelijk 300, 400 en 500 ppb).

Uit deze proeven blijkt verder dat 2,4-D een weinig efficiënt algicide is (50% groeiïnhibitie van S. opoliensis bij \pm 400 ppm en van C. reinhardi bij \pm 750 ppm).

Uit literatuurgegevens blijkt dat specifiek de beide wiersoorten die wij onderzochten zeer gevoelig zijn voor dipyridylum-herbiciden zoals paraquat en diquat. Paraquat blijkt hierbij meer efficiënt te zijn dan diquat.

- 4) Paraquat zonder uitvloeiers (PZU) is toxischer voor beide wiersoorten dan paraquat met uitvloeiers (PMU) (Bij C. reinhardi bedraagt dit verschil slechts 40 ppb). De uitvloeiers werden nochtans in de kommerciële formuleringen aan het herbicide toegevoegd om de werking van het herbicide te verhogen.

Op basis van deze vaststelling stellen wij de hypothese voorop dat de tensio-aktieve stoffen slechts de herbicide werking van paraquat verhogen in geval de plantendelen zelf lipofiel zijn zoals bij hogere planten. Bij wieren die een hydrofiele wand hebben, bestaat de mogelijkheid dat de tensio-aktieven de cellen afschermen i.p.v. het kontaktoppervlak met het herbicide te verhogen.

- 5) Door andere onderzoekers werd aangetoond dat het werkingsmechanisme van diquat bij Scenedesmus sp. hetzelfde is als

bij hogere planten : in zuurstofrijk milieu treedt er via een auto-oxidatie van het diquat-radikaal een lipiden-peroxidatie in de cellen op.

- 6) Wat betreft het werkingsmechanisme van 2,4-D kunnen we uit onze resultaten vaststellen dat bij C. reinhardi de populatiegroei van de wiersuspensie niet gelijkmatig wordt geremd : de aanlooffase duurt langer dan in de blanco-opstelling ; daarentegen is de relatieve groeikonstante van de wierpopulatie bij bepaalde concentraties herbicide groter dan in de blanco. Zoals in hogere planten uit de herbicide werking van 2,4-D zich door het verstoren van het groeipatroon van deze plantaardige cellen.
- 7) De variaties op de "difference factor" (dit is de verhouding tussen de grootste en de kleinste ED₅₀-waarde bij verschillende wiersoorten voor een bepaald produkt) tussen de verschillende produkten (met 2,4-D is er zelfs een verschil waar te nemen naargelang het criterium dat werd gebruikt om de groeiïnhibitie te bepalen), leiden tot de konklusie dat altijd meer dan één wiersoort moet gebruikt worden om het effect van een herbicide op het fytoplankton met een zekere betrouwbaarheid te evalueren.

B. De ciliaat Stylonychia mytilus

- Er werden diverse preliminaire kweekproeven met S. mytilus uitgevoerd zowel met betrekking tot de samenstelling van het medium als met de aard en de kwantiteit voeding. Met het oog op het ontwerpen van een reproduceerbare bioassay werd specifiek aandacht geschonken aan zogenaamde "inerte" voedsels. Zowel gedroogde Scenedesmus-cellen als gedroogde Saccharomyces-cellen leverden in dit verband bevredigende resultaten. Aangezien steeds in niet-axenische middens werd gewerkt moet men er tevens rekening mee houden dat omnivore soorten als S. mytilus zich eveneens voeden met de bakteriën die zich in het milieu ontwikkelen.
- De gebruikte bioassay berust op een replikatietechniek met een beperkt aantal parallellen. In niet-axenisch midden zijn herhalingen in de tijd een konditie "sine qua non" voor de reproduceerbaarheid van proeven met eencellige organismen

waarbij men zich moet steunen op het antwoord van enkele individuen en niet op het antwoord van een volledige populatie.

- De toxiciteitsproeven werden alleen met 2,4-D uitgevoerd.

Hierbij kwamen wij tot de volgende vaststellingen :

- 1) Het toedienen van voedsel in toxiciteitstesten met ciliaten blijkt noodzakelijk gezien de korte generatietijd van deze organismen. Deze voedselbron bepaalt echter mede het antwoord van de ciliaat, zowel rechtstreeks als onrechtstreeks via de bakteriële ontwikkeling in het milieu. Met 2,4-D is Stylonychia mytilus 1.5x gevoeliger indien de ciliaat met gistcellen wordt gevoed dan indien hij gedroogde wiercellen ontvangt (ED_{50}^{72} respektievelijk 118 en 181 ppm).
- 2) De voorgestelde gestandaardiseerde bioassay geeft betrouwbare resultaten en kan in een routine-onderzoek worden ingeschakeld op voorwaarde dat de lange proefperiode geen te grote moeilijkheden oplevert.

C. De crustaceeën Daphnia magna en Daphnia pulex

Met Daphnia magna-larven werd in een reeks akute testen de invloed van de lucht- en voedselvoorziening op de toxiciteit van de herbiciden nagegaan. Er werden eveneens akute testen en chronische testen met Daphnia magna-adulten uitgevoerd. Met Daphnia pulex-larven en adulten werden alleen akute toxiciteitsproeven zonder lucht- en voedselvoorziening uitgevoerd.

Uit deze experimenten kwamen volgende interessante feiten aan het licht :

- 1) Bij beide Daphniden zijn de larven gevoeliger dan de adulten ; Daphnia pulex (zowel adulten en larven) is gevoeliger dan Daphnia magna : met 2,4-D is dit zeer in het oog springend : de pulex-larven zijn 15 à 20 maal gevoeliger dan de magna-larven, de adulten 5 à 10 maal. Het verschil in gevoeligheid van beide soorten is ook belangrijk voor de uitvloeiers en voor diquat. Voor paraquat is het verschil gering.

- 2) De rangorde in toxiciteit is voor D. magna en D. pulex dezelfde (gerangschikt van hoge naar lage toxiciteit) : diquat > PMU \geq PZU > ethomeen S25 > lissapol NX \geq 2,4-D

Diquat is voor beide cladoceren het meest toxische herbicide ($TL_{50}^{24-48} \pm 0.5 \text{ ppm}$). Het al of niet toevoegen van uitvloeiers heeft slechts een geringe invloed op het effect van paraquat (voor beide formuleringen is de $TL_{50}^{48} \pm$ ppm). Dit komt doordat, enerzijds de detergenten afzonderlijk veel minder toxisch zijn dan het herbicide en anderzijds doordat er voor deze organismen geen opvallende interacties bestaan tussen het paraquat en de beide tensio-actieven.

Het herbicide 2,4-D vertoont op korte termijn slechts een geringe toxiciteit (TL_{50}^{48} D. magna 158; D. pulex 26 ppm)

- 3) Uit de chronische testen met D. magna volgt dat, in tegenstelling met de resultaten van de akute testen, 2,4-D een vrij belangrijke chronische toxiciteit heeft (TL_3 weken bedraagt 21 ppm). Het TL_{50} subleetaal effect op de reproductie is nog belangrijker : 1.25 ppm remt reeds 50% van de reproductie van D. magna. Op lange termijn heeft dit produkt een even drastisch effect op deze cladoceer als diquat dat akut het meest toxisch is.
- 4) In de statische bioassays beïnvloeden de proefomstandigheden en de voeding het antwoord van de testorganismen.
- In de akute proeven speelt de voeding slechts een kleine rol wat er op wijst dat er geen verhoogde toxiciteit optreedt via opname van het toxikans langs de voedselbaan. Het effect van de luchtdoorborreling is veel groter en bracht verschillende punten aan het licht :
- de stelling dat een konstante luchtdoorborreling zeer schadelijk is voor D. magna-larven wordt door onze resultaten tegengesproken. Om de mechanische storing tot een minimum te herleiden is het nochtans beter een diskontinue aeratie toe te dienen die juist voldoende is om het zuurstofgehalte in de testmedia op peil te houden. In de chronische testen met diskontinue aeratie

verlaagt de toxiciteit van 2,4-D met een faktor 1.7 t.o.v. de niet geaëreerde media.

- de resultaten van de proeven met D. magna-larven zouden er op wijzen dat het werkingsmechanisme van paraquat en diquat bij deze invertebraat, analoog is aan het mechanisme beschreven voor planten en zoogdieren, nl. dat de aanwezigheid van opgeloste zuurstof het toxisch effect van paraquat en diquat verhoogt door een oxidatie van deze ionen tot radikalen.

D. De crustacee Artemia salina

De proeven met larven van het pekelkreeftje als marine vertegenwoordiger van de mikrocrustacea leverden volgende vaststellingen op :

- 1) Onze resultaten bevestigen de literatuurgegevens in verband met de hogere gevoeligheid van instar II en III-larven t.o.v. instar I-larven. Dit verschil in gevoeligheid varieert naargelang het uitgeteste produkt.
- 2) Niettegenstaande Artemia salina een veel resistenter soort is dan de Daphnia-soorten, verschilt de veralgemeende rangorde in toxiciteit niet van deze opgesteld voor laatstgenoemde organismen (TL_{50} -waarden variërend tussen ± 20 tot ± 600 ppm)

diquat > PMU > PZU > 2,4-D

Het synergistisch effect van paraquat en de uitvloeiers komt in de proeven met luchtdoorborreling sterk tot uiting (TL_{50}^{48} -waarde met PMU en PZU is respektievelijk 42 en 64 ppm).

- 3) In onze toxiciteitsproeven bleek de voeding van de testorganismen het effect van de toxikanten slechts zeer weinig te beïnvloeden. De konstante luchtdoorborreling daarentegen blijkt zeer nefast te zijn voor Artemia-larven. Rekening houdend met deze slechte proefomstandigheden kan men uit de uitgevoerde proeven toch afleiden dat het werkingsmechanisme van paraquat en diquat zoals beschreven voor planten en hogere dieren, waarschijnlijk ook van toepassing is voor Artemia salina-larven.

E. De crustacee Rhithropanopeus harrisii

Deze mikroplanktonische krablarve werd gekozen als vertegenwoordiger van het bentisch estuarien milieu. Uit onze experimenten blijkt het volgende :

1) Deze kleine decapodenlarven zijn biezonder gevoelig voor de uitgeteste produkten (ED_{50} -waarden schommelend tussen ± 1 ppb en ± 1 ppm). In vergelijking met literatuurgegevens zijn dit de laagste TL_{50} -waarden ooit voor deze produkten gesignaleerd. De eerste larvale stadia van R. harrisii zijn het gevoeligst.

2) De rangorde volgens dalende toxiciteit is :

diquat \gg PZU $>$ PMU $>$ ethomeen S25 \gg 2,4-D \gg lissapol NX

Zoals voor de andere crustaceeën is diquat het meest toxische van de uitgeteste produkten. Met paraquat vonden we een interessante interactie met de detergenten : i.p.v. een synergisme werd een antagonistische werking tussen deze componenten waargenomen. De krablarven zijn dus beschermd tegen de verhoging van de membraanpermeabiliteit veroorzaakt door de detergenten. Dit antagonisme kan verklaard worden door het feit dat de detergenten, die als algemeen kenmerk een concentratie aan oppervlakken hebben, kunnen, mede door het feit dat ethomeen S25 dezelfde lading heeft dan het paraquat-ion, in een kompetitieve positie t.o.v. het herbicide komen te staan voor wat betreft de opname door de krablarven.

3) Geen van de uitgeteste produkten verhindert de R. harrisii de volledige larvale ontwikkeling te doorlopen. Wel treedt er voor sommige produkten een significante verandering in de duur van de verschillende ontwikkelingsstadia op. De twee meest opmerkelijke vaststellingen in dit verband zijn :

- Het detergent ethomeen S25 beïnvloedt specifiek het megalopa-stadium van de krab, zowel wat betreft de mortaliteit als wat betreft de ontwikkelingsduur van dit stadium ;
- 2,4-D vertraagt enerzijds de ontwikkeling van de zoealarven (vanaf 1 ppb) maar versnelt anderzijds (vanaf 10 ppb) de ontwikkeling van de megalopa-larve. Deze groei-

stimulerende werking van 2,4-D wordt in de literatuur ook gesignaleerd bij vislarven en kuikens. De analogie met de werking van 2,4-D in hogere planten kan worden gemaakt : er treedt verhoogde RNA- en eiwitsynthese op met een massale celproliferatie voor gevolg.

F. De vissen Brachydanio rerio en Poecilia reticulata

Van Brachydanio rerio werden zowel bevruchte eieren als larven en adulten in het toxikologisch onderzoek gebruikt. Met Poecilia reticulata werden enkel proeven met adulte specimens uitgevoerd.

Uit de resultaten van de experimenten met adulte vissen kunnen we volgende punten afleiden :

- 1) De resultaten bij beide vissoorten zijn analoog voor PZU, diquat en ethomeen S25 ; voor lissapol NX, PMU en 2,4-D, daarentegen, wijken de TL_{50}^{24-96} -waarden nogal af.

Brachydanio rerio is steeds gevoeliger dan Poecilia reticulata.

- 2) De volgorde volgens dalende toxiciteit is globaal genomen voor beide soorten gelijk :

ethomeen S25 > lissapol NX > PMU > diquat > PZU > 2,4-D

De twee uitvloeiers zijn zeer toxisch voor vissen (TL_{50}^{24-96} , variërend tussen 2.5 en 13.5 ppm) en de combinatie met paraquat verhoogt de toxiciteit van dit herbicide aanzienlijk. Van de uitgeteste produkten is diquat het enige produkt waarbij het effect op de vis nog sterk vergroot na een testduur van 24 uur. De werking van dit produkt heeft dus een zekere traagheid. (De TL_{50}^{24} -waarde en de TL_{50}^{96} -waarden zijn respektievelijk met B. rerio 56 en 23.5 ppm en met P. reticulata 48 en 18 ppm).

Het herbicide 2,4-D is vrij onschadelijk voor de twee gebruikte testsoorten (TL_{50}^{96} -waarde met B. rerio : 160 ppm en met P. reticulata 520 ppm). Uit literatuurgegevens kunnen wij echter afleiden dat dit alleen geldt voor het vrije zuur of voor aminezouten van 2,4-D ; andere formulerings van dit produkt zijn veel schadelijker.

Uit de resultaten van de experimenten met eieren en larven van Brachydanio rerio kunnen we het volgende besluiten :

- 1) De embryonale en larvale stadia zijn meestal minder resistent dan de adulte vissen. Brachydanio rerio-eieren zijn veel minder gevoelig voor 2,4-D, PZU en diquat dan Brachydanio-larven. Daarentegen zijn de eieren vanaf 48 u gevoeliger dan de larven voor PMU en de twee detergenten. Uit onze gegevens en uit literatuurgegevens is het duidelijk dat elk toxikans een specifiek werkingsmechanisme heeft en het kan bijgevolg een specifieke reactie van het eimembraan, van het embryo of van de larven veroorzaken, waardoor het zeer moeilijk wordt een algemene regel voorop te stellen waaruit zou blijken dat één of ander stadium gevoeliger is dan het andere.

Het inkuberen van de eieren in de testoplossing heeft slechts een geringe invloed op de gevoeligheid van de larven voor deze produkten ; de larven ontloken in de testoplossing zijn iets gevoeliger dan deze ontloken in artificieel zoetwater.

- 2) De rangorde in toxiciteit van de uitgeteste verbindingen verschilt lichtjes voor eieren en voor larven al dan niet in de testvloeistof ontloken (alleen de plaats van diquat in de rangorde is verschillend). De algemene tendenzen zijn evenwel de volgende :

- de detergenten ethomeen S25 en lissapol NX zijn voor de eieren en de twee groepen larven steeds het meest toxisch. Zoals in alle andere toxiciteitsproeven met andere organismen is het effect van ethomeen S25 (op één uitzondering na), groter dan van lissapol NX.
- De hogere toxiciteit van PMU t.o.v. PZU is zeer sterk uitgesproken voor de eieren, iets minder voor de larven ontloken in de oplossing en slechts klein voor de larven ontloken in artificieel zoetwater. Niettegenstaande de grote afzonderlijke toxiciteit van de twee uitvloeiers, kan de toxiciteit van het mengsel paraquat met uitvloeiers, ook in grote mate bepaald zijn door de synergistische werking van de verschillende componenten van het mengsel : vermits de eieren zeer gevoelig zijn voor de detergenten kan men verwachten dat een inkubatie van de eieren in subletale concentraties PMU, voor gevolg heeft dat de uitvloeiers in PMU aanwezig, de permeabi-

liteit van de membranen waarlangs het paraquat wordt opgenomen tijdens het embryonale stadium reeds dermate veranderen dat het effect van PMU op de larven groter wordt dan het effect van PZU.

- Het effect van diquat treedt zowel voor de larven als voor de eieren steeds op met een zekere traagheid. Hierdoor schuift diquat in de rangorde volgens toxiciteit naar voor op i.f.v. de testduur. Omdat dit traagheidseffect ook werd waargenomen met adulte vissen en crustaceën, formuleren wij de hypotese dat deze traagheid kenmerkend zou zijn voor het werkingsmechanisme van diquat.
- Het 2,4-D is vrijwel onschadelijk voor B. rerio-eieren en larven ($TL_{50}^{96} > 100$ ppm).

II. In een afzonderlijk hoofdstuk werd de invloed van de uitvloeiers ethomeen S25 en lissapol NX (die in sommige commerciële formuleringen een paraquat worden toegevoegd) op het effect van dit herbicide behandeld.

A. Ten einde de mogelijke interacties op te sporen tussen de verschillende componenten aanwezig in het mengsel "paraquat met uitvloeiers" (PMU) werden twee faktoriële experimenten gedaan waarin verschillende combinaties van bepaalde concentraties van de drie componenten paraquat, lissapol NX en ethomeen S25 werden uitgetest. De eerste proef werd uitgevoerd op het groenwier Scenedesmus opoliensis, de tweede op de vis Poecilia reticulata. Volgende konklusies kunnen worden naar voor gebracht :

- 1) De toxiciteit van een formulering van een herbicide wordt zelden uitsluitend bepaald door de hoeveelheid actieve stof die ze bevat. Zelfs met de kennis van de toxiciteit van elk van de afzonderlijke componenten is het nog steeds onmogelijk de toxiciteit van een mengsel ervan te voorspellen, gezien de talrijke mogelijke interacties.
- 2) Uit de proeven met Scenedesmus opoliensis blijkt dat de interacties tussen paraquat en de twee uitvloeiers verschillen naargelang de absolute concentratie van elk van de producten. Met dit groenwier werden er enerzijds combinaties

gevonden waarbij er een duidelijk synergisme optrad en anderzijds combinaties waarbij er een duidelijk antagonisme tussen de componenten optrad. De proeven met PZU en PMU afzonderlijk brachten eveneens een antagonisme aan het licht. Aan de hand van dit factorieel experiment kan de samenstelling van de commerciële formulering PMU met 50% uitvloeiers worden gerekonstrueerd : de uitvloeiers ethomeen S25 en lissapol NX zijn toegediend in een verhouding die 9:1 benadert. De exakte samenstelling van "gramoxone" werd ons onlangs vertrouwelijk medegedeeld en spreekt deze konklusie niet tegen.

- 3) Uit de proeven met Poecilia reticulata blijkt eveneens dat de interacties veranderen in functie van de samenstelling van het mengsel. Het effect van paraquat wordt door het toevoegen van detergenten (in alle mogelijke combinaties) steeds verhoogd.
- 4) Een interessante vaststelling is het feit dat het detergent dat afzonderlijk het minst toxisch voor beide testorganismen is, de toxiciteit van paraquat meer verhoogt dan de meest toxische detergent dit doet.

B. Uit de resultaten van onze toxikologische proeven blijkt er een groot verschil te bestaan tussen de verschillende testorganismen wat betreft het effect van de detergenten op de toxiciteit van paraquat.

Algemeen kunnen de gebruikte testorganismen in twee groepen worden ingedeeld :

- 1) de eerste groep organismen is deze waarvoor de toxiciteit van de detergenten afzonderlijk kleiner is dan de toxiciteit van het herbicide. Tot deze groep behoren de wieren en de crustaceeën. Voor deze groep is de invloed van de uitvloeiers op het effect van paraquat minimaal en kan men in sommige gevallen zelfs antagonistische werkingen waarnemen.
- 2) Tot de tweede groep behoren de organismen die wel zeer sterk door de uitvloeiers afzonderlijk worden aangetast. Dit zijn o.a. alle ontwikkelingsstadia van de vissen. Voor deze groep is de invloed van de additieven op het effect van paraquat wel belangrijk.

C. Uit de samenvatting van deze gegevens kunnen we volgend interaktiemechanisme tussen paraquat, lissapol NX en ethomeen S25 vooropstellen :

1) De individuele toxiciteit van hoge concentraties aan detergenten wordt veroorzaakt door een verhoging van de membraan-permeabiliteit omwille van een eiwitdenaturatie.

2) Bij die organismen die zeer gevoelig zijn voor de detergenten (bv. vissen) is er in PMU voldoende detergent aanwezig opdat de membranen waarlangs het paraquat wordt opgenomen meer doorlaatbaar zouden worden voor dit produkt.

Toch is het in deze gevallen niet mogelijk het effect van de componenten te voorspellen. Zo verhoogt lissapol NX, in het geval van P. reticulata, het effect van paraquat meer dan ethomeen S25. Dit laatste produkt is echter toxischer dan lissapol NX.

3) Bij organismen die relatief goed bestand zijn tegen het effect van de detergenten, spelen de fysische en tensio-actieve interacties tussen paraquat, de detergenten en de organismen de voornaamste rol in het effect van het mengsel. Vandaar dat de interacties zo sterk kunnen variëren naargelang de samenstelling van het mengsel.

De hydrofiel-lipofiel-interacties en adsorptieverschijnselen veroorzaken in sommige gevallen een antagonisme tussen de verschillende componenten (bv. S. opoliensis-Rhithropanopeus harrisii).

Het effect van een tensio-actieve stof afzonderlijk is in deze gevallen uiteraard nog moeilijker te korreleren met het effect van het mengsel.

III. In een derde luik van dit onderzoek werd er aandacht geschonken aan de "dosis-residu"-relatie voor de 3 herbiciden. De accumulatie t.h.v. het sediment, t.h.v. gesuspenderde wiercellen Scenedesmus opoliensis en t.h.v. de vissen Poecilia reticulata en Brachydanio rerio werd bestudeerd.

A. Uit literatuurgegevens blijkt al gauw dat paraquat en diquat zeer sterk adsorberende eigenschappen hebben. In de natuur verdwijnen beide herbiciden zeer snel uit de waterige

fraktie van het ecosysteem doch persisteren nog maanden in de sedimenten.

Ook 2,4-D adsorbeert snel aan organisch beladen bodemmateriaal doch persisteert er minder lang dan de dipyridylumderivaten. Dit herbicide vertoont bovendien de neiging om te adsorberen aan plantaardig materiaal in suspensie.

B. In experimenten met S. opoliensis hebben wij de adsorptiegraad van paraquat en diquat aan de wiersuspensie proberen te bepalen. Volgende feiten werden vastgesteld :

- 1) Scenedesmus opoliensis-cellen accumuleren meer diquat in het donker dan in het licht.

Naar analogie met literatuurgegevens is het mogelijk dat Scenedesmus preferentieel chemikaliën in het donker adsorbeert, doch in ^{het} geval van diquat speelt hoogst waarschijnlijk ook de kleinere herbicide werking van het produkt in het donker een rol in het accumulatieproces. Er zijn argumenten om aan te nemen dat op dat ogenblik nog een morfologische veranderingen van de wiercellen een rol spelen in deze accumulatie.

- 2) Paraquat accumuleert minder bij S. opoliensis dan diquat.

Uitgaande van literatuurgegevens kunnen we stellen dat de betrokken wiersoort een starre celwand heeft waarvan de moleculaire configuratie zich slechts in geringe mate kan aanpassen aan de structuur van het adsorberende produkt.

In de betrokken proefomstandigheden werd dan ook door ons slechts 5% van het aanwezige paraquat uit het milieu geaccumuleerd.

Het verschil in het percent geaccumuleerde paraquat en diquat in nochtans identieke proefomstandigheden kan worden verklaard door de grotere afstand van de geladen plaatsen in het paraquat-ion dan in het diquat-ion.

C. In een preliminair onderzoek hebben wij naar een reproduceerbare methode gezocht voor het bepalen van het residu paraquat of diquat in vissen.

Uit onze proeven met Brachydanio rerio en Poecilia reticulata kunnen wij voorlopig volgende vaststellingen afleiden :

- De primaire adsorptiefaze van paraquat aan B. rerio wordt gevolgd door een desorptiefaze. Bij een langere testduur (72 uur) akkumuleert B. rerio ongeveer 10% van de concentratie van het omgevend milieu.
- Poecilia reticulata hoopt 10 tot 100x meer paraquat op dan B. rerio en kan in lage concentraties (lager dan 32 ppm) paraquat akkumulieren tot gehalten 5x hoger dan deze van het omgevend milieu. Deze biologische concentratie neemt in belang af met stijgende concentraties van het omgevend milieu.
- Poecilia akkumuleert gemiddeld ongeveer 5x minder diquat dan paraquat. In tegenoverstelling met de resultaten met paraquat treedt er in concentraties lager dan 18 ppm diquat een biokoncentratie op die in belang toeneemt naarmate de testconcentraties stijgen.

9. ALGEMENE BESLUITEN.

Paraquat

- Aan de hand van ons onderzoek kunnen we paraquat typeren als een goed algicide dat echter zeer toxisch is voor crustaceën, slechts middelmatig toxisch is voor adulte vissen, doch daarentegen zeer nefast voor de embryonale en larvale stadia van laatstgenoemde proefdieren.

De uitvloeiers die aan het herbicide in de commerciële formuleringen worden toegevoegd, zijn voor het gebruik als aquatisch herbicide absoluut te weren. Enerzijds is het twijfelachtig dat de aard en de concentratie van de toegediende detergenten een gunstig effect hebben op het verdelgen van alle types van watervegetatie en anderzijds werd het negatief effect van deze additieven voor de aquatische fauna voldoende aangetoond.

Indien dit herbicide aan een aquatisch ecosysteem wordt toegediend is het slechts korte tijd in het water te detekteren.

Paraquat verdwijnt uit de waterige fraktie hoofdzakelijk door een adsorptie aan het sediment waarin het lang persisteert. De adsorptie aan het fytoplankton is minimaal. Belangrijk is echter dat in bepaalde omstandigheden het herbicide een biologische accumulatie in visweefsel kan vertonen.

Wij zijn dan ook de mening toegedaan dat de wettelijke bepalingen in België voor het gebruik van paraquat als aquatisch herbicide moeten worden aangepast:

- Tenzij er argumenten zouden kunnen naar voor gebracht worden die aantonen dat het toevoegen van uitvloeiers absoluut essentieel is voor het verdelgen van een bepaald type van water- of oevervegetatie, dient bij voorkeur PZU gebruikt te worden i.p.v. PMU.

- Telkens wanneer zoals voorgeschreven voor de bestrijding van aquatische vegetatie, 5 ppm gramoxone aan het water wordt toegediend (dit stemt overeen met 1 ppm paraquat-ion) zullen naast de vegetatie ook het plantaardig plankton en de gevoeligste fraktie van het zoöplankton worden gedood. De meeste vissen zullen door deze concentratie niet worden aangetaast op voorwaarde dat er geen uitvloeiers aan het paraquat zijn toegediend. Een biologische accumulatie in vissen is echter, ook bij het gebruik van PZU, niet uitgesloten.

- Het tijdstip waarop paraquat wordt aangewend is zeer belangrijk met het oog op het effect op het ecosysteem. Meestal wordt paraquat gebruikt in de lente, m.a.w. de paaitijd van de vissen en de "bloei"-periode van het zoöplankton. De reproductie van sommige gevoelige vissoorten kan door 1 ppm PZU en zeker door 1 ppm PMU worden verhinderd. Het vrijwaren van bijzonder gevoelige larvale stadia zoals deze van bepaalde mikroplanktonen (de estuariumkrab Rhithropanopeus harrisi) kan alleen gebeuren door het beperken van de toepassingsperiode van het herbicide.

Om al deze redenen verdient de Nederlandse norm voor de toepassing van paraquat navolging. Deze luidt als volgt :

Alleen paraquat zonder uitvloeiers mag worden toegepast, ten vroegste van 1 juni en de maximale dosis in het water is 2 ppm Gramoxone (d.i. 0.4 ppm paraquat-ion)
(Plantenziektekundige Dienst, Wageningen, 1975).

Diquat

- Indien we de rangorde in toxiciteit van de verschillende uitgeteste produkten vergelijken voor de verschillende vertegenwoordigers van het aquatisch ecosysteem, dan zien we dat van de 3 herbiciden paraquat het grootste effect heeft op het fytoplankton, maar dat daarentegen voor de dierlijke organismen het andere dipyridylumderivaat, diquat, het effect van paraquat overtreft.

- Algemeen valt het op dat de toxiciteit van diquat nog sterk verandert in functie van de tijd, terwijl voor de andere produkten reeds na 24 u een vrij stabiele toestand is bereikt. Dit is het duidelijkst in de proeven met de beide vissoorten, met de eieren en larven van B. rerio, met beide Daphnia-soorten en met Artemia salina. Deze traagheid van het effect van diquat op zeer verscheidene organismen kan niet uitsluitend te wijten zijn aan de snelheid waarmee het diquat door de organismen wordt geabsorbeerd. De absorptie van paraquat en diquat is wellicht voor elk organisme verschillend. Men kan echter veronderstellen dat het langer uitblijven van het effect van diquat, t.o.v. paraquat kenmerkend is voor het

werkingsmechanisme van diquat. Deze hypothese dient nog verder te worden onderzocht.

- In het natuurlijk biotoop gedraagt diquat zich op analoge wijze als paraquat. De adsorptie aan organisch beladen bodempartikels en aan het fytoplankton, is belangrijker dan bij paraquat. In onze proeven namen we wel een akkumulatie in de vissen weer, doch de concentratie in het weefsel overtrof nooit de concentratie van het omringend milieu.

De wettelijke bepalingen voor het gebruik van diquat als aquatisch herbicide zijn in België en Nederland identiek als voor paraquat. Indien zoals voorgeschreven, 5 ppm reglone (d.i. 1 ppm diquat-ion) aan het water wordt toegediend, mag men er zeker van zijn dat naat het fytoplankton ook het meerendeel van het zoöplankton zal worden verdelgd. De gevoeligheid van de onderzochte fyto- en zoöplanktonsoorten ligt voor diquat immers in dezelfde grootteorde. De meeste vissen zullen door deze concentratie niet worden gedood, maar de kans bestaat dat zeer gevoelige vislarven worden uitgeroeid.

Het tijdstip waarop diquat wordt toegepast is derhalve van kapitaal belang. De broedperiode van allerhande organismen moet zo veel mogelijk gevrijwaard blijven van diquatbehandelingen.

De gevallen waarin het werkelijk aangewezen is diquat te gebruiken i.p.v. paraquat zouden bij wet moeten worden vastgelegd. Diquat is immers weinig selektief en globaal zeer toxisch voor het volledige waterige ecosysteem. Indien diquat wel wordt toegepast verdient de Nederlandse norm aanbeveling omdat de maximale dosis en de toepassingsperiode tot een minimum werden herleid :

Maximaal 2 ppm reglone (d.i. 0.4 ppm diquat) te gebruiken vanaf 1 juni (Plantenziektekundige Dienst, Wageningen, 1975).

2,4-D

- Uit onze proeven kunnen we het triethanolaminezout van 2,4-D typeren als een weinig efficiënt algicide dat tevens slechts een geringe invloed heeft op de vertegenwoordigers van

de aquatische fauna. Toch zijn er twee belangrijke aspecten in het toxisch effect van dit produkt

- 2,4-D heeft een aanzienlijk chronisch effect op één van de onderzochte crustaceën
- het werkingsmechanisme van 2,4-D (nl. groeiregulatie) kan interfereren met de reproductie van sommige fauna-elementen.

Het 2,4-D kan ook slechts een geringe tijd in het water worden gedetekteerd ; het adsorbeert aan de bodempartikels waar het een biodegradatie ondergaat. Het teruggevonden residu in de bodem is slechts een fractie van de totale ingebrachte hoeveelheid 2,4-D ; bijgevolg is een accumulatie in flora en fauna niet uitgesloten.

2,4-D, het meest gebruikte herbicide ter wereld, is geen specifiek aquatisch herbicide, maar wordt voornamelijk aangewend tegen boven het water uitgroeiende hogere planten. Door de geringe direkte toxiciteit van 2,4-D wordt het gevaar van 2,4-D sterk onderschat.

In België zijn er geen speciale normen voorzien voor de behandeling van oppervlaktewaters.

Steunend op de belangrijke subletale effecten van dit herbicide zouden wij ook voor dit produkt ten stelligste aanraden de normen die in Nederland werden gesteld niet te overschrijden :

2,4-D mag in het water niet onder de vorm van esters worden aangewend ; de toepassing in het voorjaar is verboden ; het mag slechts vanaf eind juni, begin juli worden gebruikt, en de dosis vrij zuur in het water mag de 1 à 2 ppm actieve stof niet overschrijden. Het water van behandelde sloten mag gedurende enkele weken niet meer worden gebruikt voor land- of tuinbouw.

Tenslotte menen wij de aandacht te moeten vestigen op het ekologisch probleem bij het gebruik van aquatische herbiciden in het algemeen. Zelfs indien een herbicide op bevredigende wijze voldoet aan de voorwaarden die op toxikologisch gebied worden gesteld, zijn de schaal en de frekwentie waarmee het produkt gebruikt wordt, van primordiaal belang. Een totale eenmalige verdelging van de vegetatie in een beperkt gebied zal minder ongunstige gevolgen hebben dan een selektieve regelmatige uitroeiing van de vegetatie in een uitgestrekt gebied. Het gevaar van deze laatste toepassing bestaat er immers in dat op die manier grote "reserves" aan natuurlijk biologische gemeenschappen onherstelbaar kunnen worden vernietigd.

10. SAMENVATTING

In de laatste decennia is het gebruik van bestrijdingsmiddelen niet meer uit de moderne landbouwtechnieken weg te denken. Overtuigd door de grote suksessen die men behaalde in de terrestrische onkruidbestrijding, wendde men de herbiciden paraquat, diquat en 2,4-D tevens aan ter verdelging van de aquatische en de oevervegetatie. Doch in een aquatisch ecosysteem zijn behalve de te bestrijden soort ook de ander biota in een nauwer kontakt met het toegediende produkt. De neveneffekten bij het gebruik van herbiciden in het aquatisch ecosysteem mogen derhalve niet worden onderschat, te meer omdat de toxiciteit van de gebruikte produkten op de verschillende komponenten van deze biologische gemeenschap meestal onbekend is.

Omdat toxikologisch onderzoek op verschillende vertegenwoordigers van het aquatisch ecosysteem een dringende noodzaak is geworden, gingen wij in deze studie het effect na van 2,4-D, diquat en van twee formuleringen van paraquat, op enkele primaire producenten, primaire konsumenten, secundaire konsumenten en afbrekers.

Om een extrapolatie te kunnen maken van de resultaten van dergelijke laboratoriumproeven, naar het effect van een produkt in het natuurlijk milieu dient de partitionering, de akkumulatie en de persistentie van dit produkt te worden bestudeerd.

Het verschil tussen de twee gebruikte paraquat-formuleringen bestaat in een additie van twee detergenten aan één van beide oplossingen. Dit zijn : lissapol NX en ethomeen S25. In alle proeven werden beide paraquat-formuleringen en beide tensio-aktieven, 'uitvloeiers' genaamd, in parallel uitgetest. Bovendien werden er twee 'faktoriële' experimenten uitgevoerd om de interakties tussen de verschillende komponenten van de mengsels na te gaan.

Uit het toxikologisch onderzoek kunnen wij afleiden dat er een groot verschil bestaat in gevoeligheid tussen de verschillende groepen organismen, tussen de verschillende organismen van eenzelfde groep, en tussen ontwikkelingsstadia van eenzelfde soort.

De rangorde in toxiciteit verandert weinig bij de uitgeteste groepen. Veralgemeend is diquat toxischer dan paraquat of is het effect van beide produkten vrijwel gelijk (TL_{50} enkele ppm). Op korte termijn is 2,4-D een vrij onschadelijk produkt (TL_{50} 100 ppm). Op lange termijn vertoont 2,4-D in een concentratie van enkele ppm een belangrijk subletaal effect. De herbiciden hebben reeds een duidelijke invloed op de overleving en de reproductie van bepaalde dierlijke organismen in concentraties die dienen te worden aangewend voor de onkruidbestrijding (in België gebruikt men 5 ppm gramoxone).

Paraquat met uitvloeiers is toxischer dan paraquat zonder uitvloeiers, op enkele uitzonderingen na. Deze uitzonderingen en de resultaten van de faktoriele experimenten zijn argumenten om het gebruik van paraquat met uitvloeiers in een aquatisch ecosysteem te vermijden.

De twee detergenten zelf zijn zeer schadelijk voor vissen.

Bij de studie van de partitionering van de onderzochte dipyridylumherbiciden, paraquat en diquat, worden de grootste residus waargenomen in de sedimenten. De ophoping van deze herbiciden in wiercellen is gering (5-30 % van de uitwendige concentratie), doch in vissen kan de inwendige concentratie de uitwendige benaderen en in sommige gevallen tot 5 maal overschrijden.

In het licht van deze resultaten menen wij dat het gebruik van paraquat, diquat en 2,4-D voor het verdelgen van aquatische vegetatie met biezondere voorzorgen dient te gebeuren. Wij vinden het derhalve wenselijk dat de Belgische wetgeving die het gebruik van de onderzochte herbiciden bepaalt, wordt aangepast door 1) een verlaging van de maximaal toelaatbare dosis, 2) het vermijden van bepaalde formuleringen, en 3) een beperking van de gebruiksperiode zodat de voortplantingsperiode van de meeste organismen gevrijwaard blijft van herbiciden.

L I T E R A T U U R L I J S T

=====

- ABEDI, Z.H. & W.P. Mc KINLEY, 1968 :
Zebra fish eggs and larvae as aflatoxin bioassay test.
J.A.O.A.C., 51 (4), 902-906
- ABEDI, Z.H. & D.E. TURTON, 1968 :
Note on the response of zebra fish larvae to folpet and difolatan.
J.A.O.A.C., 51 (5), 1108-1109
- ABEL, P.D., 1974 :
Toxicity of synthetic detergents to fish and aquatic invertebrates.
J. Fish. Biol., 6, 259-298
- ALABASTER, J.S., 1969 :
Survival of fish in 164 herbicides, insecticides, fungicides, wetting agents and miscellaneous sunstances.
Intern. Pest. Control, march-april 1969, 29-36
- ALY, O.M. & S.D. FAUST, 1964 :
Studies on the fate of 2,4-D and ester derivatives in natural surface waters.
J.Agr. Food Chem., 12, 541-546
- AMLING, H.J., J.T. TURNER & T.D. TAYLOR, 1963 :
Preliminary evaluation of two dipyridyl quaternary salts for post-emergent weed control in apple, peach and pecan plantings.
Proc. S.W.C., 16, 164
- ANDERSON, B.G., 1944 :
The toxicity thresholds of variuos substances found in industrial wastes as determined by the use of Daphnia magna .
Sewage Works J., 16, 1156-1165
- ANDERSON, B.G., 1950 :
The apparent thresholds of toxicity to D.magna for chlorides of various metals when added to lake Erie water.
Trans. Amer. Fish. Soc., 78, 97-112
- ANTSYSHKINA, L.M., A.D. DYGA, N.S. KIRILENKO and G.B. MELNIKOV, 1969 :
A method of breeding Daphnia magna in the laboratory.
Z. vergl. Physiol., 36 (4), 115-117
- ARMSTRONG, D.G., 1966 :
Hypothesis concerning the mechanism of auxin action.
Proc. nat. Acad. Sci. USA, 56, 64-66
- ASHTON, F.M. & A.S. CRAFTS, 1973 :
Mode of action of herbicides.
John Wiley & sons Inc., N.Y., 504 pp.
- AUTOR, A.P., 1974 :
Reduction of paraquat toxicity by superoxide dismutase.
Life Sciences, 14, 1309-1319
- BACH, M.K., 1961 :
Metabolites of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid from bean stems.
Plant. Physiol., 36, 558-565

- BALDWIN, R.C., A. PASI, J.T. Mc GREGOR and C.H. HINE, 1975 :
The rates of radical formation from the dipyridylum herbicides paraquat, diquat and morfamquat in homogenates of rat lung, kidney and liver: an inhibitory effect of carbon monoxide.
Toxicol. and applied Pharmacol., 32, 298-304
- BARNES, J.M., 1969 :
Poisons that hit and run.
New Sci., 38, 619-620
- BAUR, J.R., R.W. BOVEY, P.S. BAUR and Z. EL-SEIFY, 1969 :
Effects of paraquat on the ultrastructure of mesquite mesophyll cells.
Weed Res., 9, 81-85
- BELL, G. R.; 1956 :
On the photochemical degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and structurally related compounds in the presence and absence of riboflavin.
Botanical Gazette, 118, 133-136
- BELLAN, G., D.J. REISH and J.P. FORET, 1972 :
The sublethal effects of a detergent on the reproduction, development and settlement in the polychaetous annelid Capitella capitata.
Mar. Biol., 14, 183-188
- BEST, J.A., J.B. WEBER & S.B. WEED, 1972 :
Competitive adsorption of diquat, paraquat and Ca on organic matter and exchange resins.
Soil Sci., 114, 444-447
- BIESINGER, K.E., R.W. ANDREW & J.W. ARTHUR, 1974 :
Chronic toxicity of NTA (Nitrilotriacetate) and metal-NTA complexes to Daphnia magna.
J. Fish. Res. Bd Can., 31 (4), 486-490
- BIESINGER, K.E., & G.M. CHRISTENSEN, 1972 :
Effects of various metals on survival, growth, reproduction and metabolism of Daphnia magna.
J. Fish. Res. Bd Can., 29 (12), 1691-1700
- BLACK, C. C. Jr & L. MEYERS, 1966 :
Some biochemical aspects of the mechanism of herbicidal activity.
Weeds, 14, 331-338
- BLANC, M., P. BANARESCU, J.L. GAUDET & J.C. HUREAU, 1971 :
European inland water fish. A multilingual catalogue.
Fishing News (Books) Ltd, England, 191 pp.
- BLISS, C.I., 1937 :
The calculation of the time-mortality curve.
Ann. appl. Biol., 24, 815-852
- BORCHARD, F., B. GRABENSEE, W. JAX and F. HUTH, 1974 :
Morphological findings in cases of paraquat poisoning.
Klin. Wrschr., 52, 657-671
- BRAATEN, B., A. GRANMO, and R. LANGE, 1972 :
Tissue-swelling in Mytilus edulis L. induced by exposure to a non-ionic surface-active agent.
Norwegian J. Zool., 20 (2), 137-140

- BOOKHOUT, C.G., A.J. WILSON, T.W. DUKE and J.I. LOWE, 1972 :
Effects of mirex on the larval development of two crabs.
Water, Air and Soil Pollution, 1, 165-180
- BRANSON, D.R., G.E. BLAU, H.C. ALEXANDER and W.B. NEELY, 1975 :
Bioconcentration of 2,2',4,4'-tetrachlorobiphenyl in rainbow trout as measured by an accelerated test.
Trans. Am. Fish. Soc., 4, 785-792
- BRIAN, R.C., R.F. HOMER, J. STUBBS and R.L. JONES, 1958 :
A new herbicide; 1,1'-ethylene,2,2'-dipyridylum dibromide.
Naure, Lond., 181, 446
- BRINGHAM, G. & R. KUHN, 1959 :
Wasser-toxikologische Untersuchungen mit Protozoen als Testorganismen.
Gesundheits-Ingenieur, 80 (8), 239-242
- BROOKS, R.E., 1971 :
Ultrastructure of lung lesions produced by ingested chemicals;
I. Effect of the herbicide paraquat on mouse lng.
Lab. Invest., 25 (6), 536-545
- BULLIVANT, C.M., 1966 :
Accidental poisoning by paraquat : report of two cases in man.
Br. med. J., 1, 1272-1273
- BURBANCK, W.D. & D.M. SPOON, 1967, 1967 :
The use of sessile ciliates collected in plastic dishes for rapid assessment of water pollution.
J. Protozool., 14 (4), 739-744
- BURNET, A.M.R., 1972 :
Effects of paraquat on invertebrates in a Canterbury stream, New Zealand.
New Zealand J. mar. & freshw. Res., 6 (4), 448-455
- BURNS, I.G. & HAYES, M.H.B., 1974 :
Some physico-chemical principles involved in the adsorption of the organic cation paraquat by soil humic materials.
Pesticide Reviews, 52, 115-146
- BURNS I.G., M.H.B. HAYES and M. STACEY, 1972 :
Some physico-chemical interactions of paraquat with soil organic materials and model compounds. II. Adsorption and desorption equilibria in aqueous suspensions.
Weed Res. 13, 79
- BUS, J.S., S.D. AUST & J.E. GIBSON, 1974 :
Superoxide- and singlet oxygen-catalyzed lipid peroxidation as a possible mechanism for paraquat (methyl viologen) toxicity.
Biochem. & Biophys. Res. Comm., 58 (3), 749-755
- CAIRNS, J. Jr, 1969 :
Fish-bioassays. Reproducibility and rating.
Revta Biol., 7 (1-2), 7-12
- CALDERBANK, A., C.B. MORGAN and S.H. YUEN, 1961 :
Determination of diquat residues in potato tubers.
Analyst, 86, 569-579
- CALDERBANK, A. and S.H. YUEN, 1965 :
An ion exchange method for determining paraquat residues in food crops
Analyst, 90, 99

- CALDERBANK, A. and P. SLADE, 1966 :
The fate of paraquat in plants.
Outlook on Agriculture, 5 (2), 55-59
- CALDERBANK, A., 1968 :
The bipyridylium herbicides.
Adv. in Pest Control Res. Comm., 19, 397-400
- CARTER, L., 1965 :
Investigations on the toxicity of paraquat and diquat to fresh-water fish and molluscs.
Research department memorandum, PVM 45/C/912, ICI
- CARTER, L. & B.R.H. WILLIAMS, 1968a :
Literature survey; The effects of paraquat on fish and other aquatic fauna.
Brixham Research Laboratory Report ICI, BL/B/1255
- CARTER, L. & B.R.H. WILLIAMS, 1968b :
The toxicity of 'Gramoxone' to brown trout.
Brixham Laboratory Technical Report ICI PVM 45/C/1250
- CHANG, H.C., J.W. RIP & J.H. CHERRY, 1974 :
Effects of phenoxyacetic acids on rat liver tissues.
J.Agr. Food Chem., 22 (1), 62-65
- CHRISTIANSEN, M.E. and J.D. COSTLOW Jr, 1975 :
The effect of salinity and cyclic temperature on larval development of the mud-crab Rhithropanopeus harrisii (Brachyura:Xanthidae) reared in the laboratory.
Marine Biol., 32, 215-221
- CLARK, D.G., 1971 :
Inhibition of the absorption of paraquat from the gastrointestinal tract by adsorbents.
Brit. J. industr. Med., 28, 186-188
- CLARK, D.G., T.F. Mc ELLIGOTT & W.E. HURST, 1966 :
The toxicity of paraquat.
Brit. J. industr. Med., 23, 126-132
- CLARK, D.E., J.S. PALMER, R.D. RADELEFF, H.R. CROOKSHANK & F.M. FARR, 1975 :
Residues of chlorophenoxy acid herbicides and their phenolic metabolites in tissues of sheep and cattle.
J. Agr. Food Chem., 23 (3), 573-578
- COATS, G.E., H.H. FUNDERBURK Jr, J.M. LAWRENCE and D.E. DAVIS, 1966 :
Factors affecting persistence and inactivation of diquat and paraquat.
Weed Res., 6, 58
- COBLE, H.D., F.W. SLIFE and H.S. BUTLER, 1970 :
Absorption, metabolism and translocation of 2,4-D by honeyvine milkweed.
Weed Sci., 18 (5), 653-656
- CONAWAY, C.C. & F. MATSUMURA, 1975 :
Alteration of cellular utilization of thymidine by TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin).
Bull. Environ. Contam. Toxicol., 13 (1), 52-56

- CONNING, D.M., K. FLETCHER & A.A.B. SWAN, 1969 :
Paraquat and related bipyridyls.
Br. med. Bull., 25 (3), 245-249
- COOLEY, N.R., 1954 :
The influence of certain antibiotics upon population growth of Tetrahymena pyriformis (Ehrenberg, 1930) Lwoff, 1947 strain W.
Dissertation Abstracts, 14 (10), 1-4
- COOLEY, N.R., J.M. KELTNER & J. FORESTER Jr, 1972 :
Mirex and arochlor^R 1254 : Effect on and accumulation by Tetrahymena pyriformis strain W.
J. Protozool., 19 (4), 636-638
- COOLEY, N.R., J.M. KELTNER & J. FORESTER Jr, 1973 :
The polychlorinated biphenyls, arachlors^R 1248 and 1260 : Effect on and accumulation by Tetrahymena pyriformis.
J. Protozool., 20 (3), 443-445
- COPE, O.B., E.M. WOOD and G.H. WALLEN, 1970 :
Some chronic effects of 2,4-D on the bluegill (Lepomis macrochirus).
Trans. Am. Fish. Soc., 99 (1), 1-12
- CORBIN, F.T., J.B. WEBER & R.P. UPCHURCH, 1965 :
The influence op pH on the detoxication of herbicides in soil.
Proceed. S. Weed Conf., 18, 668
- COSTLOW, J.D. Jr & C.G. BOOKHOUT, 1959 :
The larval development of Callinectes sapidus Rathbun reared in the laboratory.
Biol. Bull., 116 (3), 373-396
- COSTLOW, J.D. Jr & C.G. BOOKHOUT, 1960 :
A method for developing Brachyuran eggs in vitro.
Limnology & Oceanography, 5 (2), 212-215
- COSTLOW, J.D. Jr & C.G. BOOKHOUT, 1961 :
The larval stages of Panopeus herbstii Milne-Edwards reared in the laboratory.
J. Elisha Mitchell Sc. Soc., 77 (1), 33-42
- COSTLOW, J.D. Jr, C.G. BOOKHOUT & J. MONROE, 1960 :
The effect of salinity and temperature on larval development of Sesarma cinereum (Bosc) reared in the laboratory.
Biol. Bull. mar. biol. Lab., Woods Hole 118, 183-202
- COSTLOW, J.D. Jr, C.G. BOOKHOUT & J. MONROE, 1962 :
Salinity-temperature effects on the larval development of the crab Panopeus herbstii Milne-Edwards reared in the laboratory.
Physiol. Zool., 35, 79-93
- COSTLOW, J.D. Jr, C.G. BOOKHOUT & J. MONROE, 1966 :
Studies on the larval development of the crab Rhithropanopeus harrisi (Gould). I. The effect of salinity and temperature on larval development.
Physiol. Zool., 39, 81-100
- COUCH, R.W. & D.E. DAVIS, 1966 :
Effects of atrazine, bromacil and diquat on ¹⁴CO₂-uptake and translocation of Phaseolus vulgaris.
Proc. Roy. Soc., 157 B, 332-345

- CROSBY, D.G. & R.K. TUCKER, 1966 :
Toxicity of aquatic herbicides to Daphnia magna.
Science, 154, 289-291
- CROSBY, D.G. and A.S. WONG, 1973 :
Photodecomposition of p-chlorophenoxyacetic acid.
J. Agr. Food Chzm., 21 (6), 1049-1052
- CURDS, C.R. and J.M. VANDYKE, 1966 :
The feeding habits and growth rates of some ciliates found in activated sludge plants.
J.appl. Ecol., 3, 127-137
- DANIEL, J.W. and J.C. GAGE, 1966 :
Absorption and excretion of diquat and paraquat in rats.
Brit. J. ind. Med., 23, 133-136
- DANGEARD, P., 1933 :
Traité d'Algologie.
Paul Lechevalier & fils, Paris, 441 pp.
- DAVENPORT, H.E., 1963 :
The mechanism of cyclic phosphorylation by illuminated chloroplasts.
Proc. Roy. Soc., 157 B, 332-345
- DAVIES, O.L., 1954 :
The design and analysis of industrial experiments.
Oliver & Boyd, Edinburgh, 578 pp.
- DAVIS, A.C., 1961 :
Effects of some pesticides on egg and larvae of oysters (Crassostrea virginica) and clams (Venus mercenaria).
Comm. Fish. Res., 23, 8-23
- DAVIS, E.A., 1953 :
Nitrate reduction by Chlorella.
Plant Physiol., 28, 539-544
- DEHAEMERS, R., 1975 :
Tertiaire reiniging van bio-industriële alval door algenkweek.
Verhandeling voorgelegd tot het behalen van de graad van landbouwkundig ingenieur, R.U.G., 80 pp.
- DIEGUEZ-CARBONELL, P. & C.R. PASCUAL, 1974 :
Adsorption of the herbicide 2,4-D by montmorillonite.
IUPAC 3th international Congress, 3-9 July 1974, Helsinki, 237-242
- DIETRICH, G., and K.KALLE, 1963 :
General Oceanography.
Interscience, New York, 280 pp.
- DIVE, D., 1973 :
Nutrition holozoïque de Colpidium campylum. Phénomènes de sélection et d'antagonisme avec les bactéries.
Water Res., 7, 695-706
- DODGE, A.D., N. HARRIS and B.C. BALDWIN, 1970 :
The mode of action of paraquat and diquat.
Biochem. J., 118, 43-44

- DOUDOROFF, P., B.G. ANDERSON, G.E. BURDICK, P.S. GALTISOFF, W.B. HART, R. PATRICK, E.R. STRONG, E.W. SURBER and W.M. MANHORN, 1951 :
Bio-assay methods for the evaluation of acute toxicity of industrial wastes to fish.
Sewage ind. Wastes, 23, 1380-1397
- DUNACHIE, J.F. and W.W. FLETCHER, 1967 :
Effect of some herbicides on the hatching rate of hen's eggs.
Nature, 215, 1406-1407
- FANG, S.C., 1958 :
Absorption, translocation and metabolism of ¹⁴C-2,4-D in pea and tomato plants.
Weeds, 6, 179-186
- FARRINGTON, J.A., M. EBERT, E.J. LAND and K. FLETCHER, 1973 :
Bipyridylum quaternary salts and related compounds. V. Pulse-radiolysis studies of the reaction of paraquat radical with oxygen. Implications for the mode of action of bipyridyl herbicides.
Biochim. & Biophys. Acta, 314, 372-381
- FEE, J.A. and H.D. TEITELBAUM, 1972 :
Evidence that superoxide dismutase plays a role in protecting red blood cells against peroxidative hemolysis.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 49, 150-158
- FEUNG, C.S., R.H. HAMILTON & R.O. MUMMA, 1973a :
Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. IV. Mass spectra and chromatographic properties of amino acid conjugates.
J. Agr. Food Chem., 21 (4), 632-637
- FEUNG, C.S., R.H. HAMILTON and R.O. MUMMA, 1973b :
Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. V. Identification of metabolites in soybean callus tissue cultures.
J. Agr. Food Chem., 21 (4), 638-640
- FEUNG, C.S., R.O. MUMMA and R.H. HAMILTON, 1974 :
Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. VI. Biological properties of amino acid conjugates.
J. Agr. Food Chem., 22 (2), 307-309
- FEUNG, C.S., R.O. MUMMA and R.H. HAMILTON, 1975 :
Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. VII. Comparison of metabolites from five species of plant callus tissue cultures.
J. Agr. Food Chem., 23 (3), 373-376
- FISCHER, 1935 :
The design of experiments.
Oliver & Boyd, Edinburgh
- FISCHER, H.K., J.A. CLEMENTS, D.F. TIERNEY and R.R. WRIGHT, 1975 :
Pulmonary effects of paraquat in the first day after injection.
Am. J. Physiol., 228 (4), 1217-1223
- FISCHER, H.K., J.A. CLEMENTS and R.R. WRIGHT, 1973 :
Enhancement of oxygen by the herbicide paraquat.
Am. Rev. of respiratory Disease, 107, 246-252

- FENELLY, J.J., M.X. FITZGERALD & O. FITZGERALD, 1971 :
Recovery from severe paraquat poisoning following forced diuresis and immunosuppressive therapy.
J. Irish med. Ass., 64, 69-71
- FLEEKER, J. & R. STEEN, 1971 :
Hydroxylation of 2,4-D in several weed species.
Weed Sci., 19, 507-510
- FLETCHER, K., 1974 :
Paraquat poisoning.
Forensic Toxicology. (ed. B. BALLANTYNE), Bristol: 86-98
- FLETCHER, K. & I. WYATT, 1970 :
The composition of lung lipids after poisoning with paraquat.
Brit. J. exp. Path., 51, 604-611
- FLETCHER, K. & I. WYATT, 1972 :
The action of paraquat on the incorporation of palmitic acid into dipalmitoyl lecithin in mouse lungs.
Brit. J. exp. Path., 53, 225-230
- FOWLER, B.A. & R.E. BROOKS, 1971 :
Effects of the herbicide paraquat on the ultrastructure of mouse kidney.
Am. J. of Pathol., 63 (3), 505-512
- FOYN, B., 1934 :
Lebenszyklus, Cytologie und Sexualität der Chlorophyceae, Cladophora suhriana Kützing.
Arch. Protistenk., 83, 1-56
- FOGG, G.E., 1966 :
Algal cultures and phytoplankton ecology.
University of Wisconsin Press, Madison, Wilwaukee & London, 126 pp.
- FRANK, P.A., 1970 :
Degradation and effects of herbicides in water.
First FAO international Conference on Weed Control, June 22-July 1, 1970
Davis, California.
- FRANK, P.A. & R.D. COMES, 1967 :
Herbicidal residues in pond water and hydrosol.
Weeds, 15, 210-213
- FRYER, J.D., R.J. HANCE & J.W. LUDWIG, 1975 :
Long-term persistence of paraquat in a sandy loam soil.
Weed Research, 15, 189-194
- FUNDERBURK, H.H. jr and J.M. LAWRENCE, 1963a :
Absorption and translocation of radioactive herbicides in submersed and emerged aquatic weeds.
Weed Research, 3, 304-311
- FUNDERBURK, H.H. Jr and J.M. LAWRENCE, 1963b :
A sensitive method for determination of low concentrations of diquat and paraquat.
Nature, 199, 1011-1012
- FUNDERBURK, H.H. Jr and J.M. LAWRENCE, 1964 :
Mode of action and metabolism of diquat and paraquat.
Weeds, 12, 259-264

- FUNDERBURK, H.H. Jr and G.A. BOZARTH, 1967 :
Review of the metabolism and decomposition of diquat and paraquat.
J. Agr. Food Chem., 15 (4), 463-467
- GADDUM, J.H., 1953 :
Bioassays and mathematics.
Pharmacol. Rev., 5, 87-134
- GAGE, J.C., 1968 :
The action of paraquat and diquat on the respiration of liver cell fractions.
Biochem. J., 109, 757
- GAMAR, Y., & M.A. MUSTAFA, 1975.:
Adsorption and desorption of diquat and paraquat on arid-zone soils.
Soil Science., 119 (4), 290-295
- GENERMONT, T., 1969 :
Quelques caractéristiques des populations de Paramecium aurelia adaptées au chlorure de calcium.
Protistologica, 5, 101-108
- GIBALDI, M. & S. FELDMAN, 1970 :
Mechanisms of surfactant effects on drug absorption.
J. Pharmaceutical Sciences, 59 (5), 579-589
- GIBSON, J.E., 1975 :
Paraquat and diquat toxicity.
Grant application, Michigan State University
- GILDERHUS, P.A., 1967 :
Effects of diquat on bluegills and their food organisms.
The progressive Fish culturist, , 67-74
- GREGORY, W.W. Jr, J.K. REED & L.E. PRIESTER, 1969 :
Accumulation of parathion and DDT by some algae and protozoa.
J. Protozool., 16 (1), 69-71
- GUILLARD, R.R.L., 1973 :
Division rates in: Handbook of Phycological Methods, Culture Methods and Growth Measurements. Ed. J.R. STEIN. Cambridge University Press LONDON, New York, 448 pp.
- HAIRSTON, N.G., F.E. SMITH & L.B. SLOBODKIN, 1960 :
Community structure population control and competition.
Am. Naturalist, 94, 421-425
- HANSEN, D.J., S.C. SCHIMMEL and J.M. KELTNER, Jr, 1973 :
Avoidance of pesticides by grass shrimp (Palaemonetes pugio).
Bull. env. Contam. & Toxicol., 9 (3), 129-133
- HARRIS, C.I. & G.F. WARREN, 1964 :
Adsorption and desorption of herbicides by soil.
Weeds, 12, 120
- HEMINGWAY, R.J., J.P. LEAHEY, J.A. DAVIS and R.E. GRIGGS, 1975
Paraquat-excretion and metabolism in ruminants
I.C.I Jealott's Hill Research Station, Bracknell, Berkshire, 10 pp.

- HENSEL, G. & F. DURR, 1971 :
Investigations into the elimination of paraquat and its ability to be dialyzed.
Medische Welt, 45, 1791-1794
- HILTIBRAN, R.C., 1967 :
Effects of some herbicides on fertilized fish eggs and fry.
Trans. Am. Fish. Soc., 96 (4), 414-416
- HISAOKA, K.K. & H.I. BATTLE, 1958 :
The normal developmental stages of the zebrafish Brachydanio rerio (HAMILTON-BUCHANAN).
J.Morph., 102, 311-328
- HOLLISTER, T.A. & G.E. WALSH, 1973 :
Differential responses of marine phytoplankton to herbicides: oxygen evolution.
Bull. environm. Contam. Toxicol., 9 (5), 291-295
- HOMER, R.F., G.C. MEES & T.E. THOMBLINSON, 1960 :
Mode of action of dipyridyl quaternary salts as herbicides .
J. Sci. Food Agric., 11, 309-315
- HOSOKAWA, H., et al., 1956 :
Clinical observation of the encephalopathia from unknown cause in Minamata district of Kyushu, Japan.
J. Kumamoto medical Soc., 30, 1252-1258
- HUBSCHMAN, J.H. & R.A. ENGEL, 1965 :
Toxicity of rubber stoppers to Daphnia magna Strauss.
Nature, 205 (4975), 1029
- HUGHES, J.S. and J.T. DAVIS, 1963 :
Variations in toxicity to bluegill sunfish of phenoxy herbicides.
Weeds, 11, 50-53
- HUGHES, J.S. and J.T. DAVIS, 1962 :
Toxicity of selected herbicides to bluegill sunfish.
Proc. Louisiana Acad. Sciences, 25 (12), 86-93
- HUGHES, J.S. and J.T. DAVIS, 1964 :
Effects of selected herbicides on bluegill sunfish.
Proc. 18th ann. Conf., S.E. Assoc. Game and Fish Commiss.
- ILETT, K.I., B. STRIPP, R.H. MENARD, W.D. REID & J.R. GILLETTE, 1974 :
Studies on the mechanism of the lung toxicity of paraquat. Comparison of tissue distribution and some biochemical parameters in rats and rabbits.
Toxicol. appl. Pharmacol., 28, 216-226
- ISENSEE, A.R., P.C. KEARNEY, E.A. WOOLSON, G.E. JONES and V.P. WILLIAMS, 1973 :
Distribution of alkyl arsenicals in model ecosystem.
Environ. Sci. Technol., 7 (9), 841-845
- JENSEN, S. & A. JERNELOVA, 1969 :
Biological methylation of mercury in aquatic organisms.
Nature, Lond., 223 (5207), 753-754
- KAMLER, E., O. MATLAK & K.SROKOSZ, 1974 :
Further observations on the effect of sodium salt of 2,4-D on early developmental stages of carp (Cyprinus carpio).
Pol. Arch. Hydrobiol., 21 (3/4), 481-502

- KENAGA, E.E. , 1975 :
Partitioning and uptake of pesticides in biological systems.
in: Environmental dynamics of pesticides. (eds R. HAGUE & V.H. FREED)
Plenum Press, New York, 217-273
- KEY, J.L. , 1963 :
Studies on 2,4-D induced changes in ribonucleic acid metabolism
in excised corn mesocotyl tissue.
Weeds, 11, 177-181
- KHAN, S.U. , 1974 :
Adsorption of 2,4-D from aqueous solution by fulvic acid-clay
complex.
Environ. Sci. Technol., 8 (3), 236-238
- KHAN, S.U., P.B. MARRIAGE & W.J. SAIDAK, 1975 :
Residues of paraquat in an orchard soil.
Can. J. Soil Sci., 55, 73-75
- KHAN, H.M. and M.A.Q. KHAN, 1974 :
Biological magnification of photodieldrin by food chain organisms.
Arch. envir. Cont. Toxicol., 2 (4), 289-301
- KHANNA, S. & FANG, S.C. , 1966
J. Agr. Food Chem., 14, 500
- KHERA, K.S., L.L. WHITTA and D.J. CLEGG, 1970 :
Embryopathic effects of diquat and paraquat in rats.
Pesticides Symposia, 1970, 257-261
- KIMBOURGH, R.D. , 1974 :
Toxic effects of the herbicide paraquat.
Chest, 65, 65S-67S
- KLEIN , W. , 1972 :
Metabolism of pesticides in higher plants.
in EQS volume 1 :Global aspects of chemistry, -toxicology and techno-
logy as applied to the environment. Georg. Thieme Verlag, Stuttgart.
- KNOWLES, P.F., J.F. GIBSON, F.M. PICK & R.C. BRAY, 1969 :
Electron-spin-resonance evidence for enzymic reduction of oxygen
to a free radical, the superoxide ion.
Biochem. J., 111, 53-58
- KOCHER, C., W. ROTH & J. TREBOUX, 1953 :
Bestimmung kleiner Mengen Insektizide mit Daphnia pulex de Geer.
Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft, 26,
47-55
- KURLAND, L.T., FARO, S.N. & H. SEIDLER, 1960 :
Minamata disease.
World Neurology, 1, 370-395
- LAWRENCE, J.M., P.G. BEASLEY & H.H. FUNDERBURK Jr, 1963 :
Water quality in plastic pools containing aquatic plants, before
and after treatments with bipyridylum compounds.
Proc. S.W.C., 16, 366-367

- LEAHEY, J.P. and R.J. HEMINGWAY, 1975 :
The metabolism of diquat in hens and residues in eggs and tissues.
I.C.I. Jealott's Hill Research Station, Bracknell, Berkshire, 10 pp.
- LEE, G.F., 1973 :
Review paper: Chemical aspects of bioassay techniques for establishing water quality criteria.
Water Research, 7, 1525-1546
- LEVY, G. and W.J. JUSKO, 1965 :
J. Pharmacol. Sci., 54, 219
- LEWIN, R.A., 1962 :
Physiology and Biochemistry of Algae.
Academic Press, New York, London, 929 pp.
- LITCHFIELD, J.T. Jr, 1949 :
A method for rapid graphic solution of time-per cent effect curves.
J. Pharm. exp. Therapeutics, 97, 399-408
- LITCHFIELD, J.T. Jr & WILCOXON, 1948 :
A simplified method for evaluating Dose-Effect experiments.
J. Pharm. exp. Therapeutics, 96, 99-113
- LITCHFIELD, M.H., J.W. DANIEL and S. LONGSHAW, 1973 :
The tissue distribution of the bipyridylum herbicides diquat and paraquat in rats and mice.
Toxicology, 1, 155-165
- LUCKWILL, L.C. & C.P. LLOYD-JONES, 1960a
Metabolism of plant growth regulators. I. 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in leaves of red and black currant.
Ann. appl. Biol., 48, 613-675
- LUCKWILL, L.C. & C.P. LLOYD-JONES, 1960b :
Metabolism of plant growth regulators. II. Decarboxylation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in leaves of apple and strawberry.
Ann. appl. Biol., 48, 626-636
- LUTMAN, P.J.W., G.R. SAGAR, C.M. MARSHALL and D.W.R. HEADFORD, 1974 :
The influence of nutrient status on paraquat activity.
Weed Research, 14 (6), 355-364
- MALONEY, T.E. & C.M. PALMER, 1956 :
Toxicity of six chemical compounds to thirty cultures of algae.
Water & Sewage Works, November 1956, 509-513
- MANTKELOW, B.W., 1967 :
The loss of pulmonary surfactant in paraquat poisoning : a model for the study of the respiratory distress syndrome.
Brit. J. exp. Pathol., 48, 366
- MARCHETTI, R., 1965 :
The toxicity of nonylphenol ethoxylate to developmental stages of the rainbow trout, Salmo gairdneri Richardson.
Ann. appl. Biol., 55, 423-430

- MARTENS, M.A., & A. HEYNDRICKX, 1974 :
 Analysis of paraquat in aqueous solutions by pyrolysis gaschromatography.
 J. Pharm. Belg., 29 (5), 444-448
- MARTENS, M.A., C.H. VAN PETHEGHEM & A. HEYNDRICKX, 1975
 The analysis of paraquat in biological samples by means of combined pyrolysis gaschromatography-massfragmentography.
 XXVII int. Symp. Crop Protect., Ghent 6-5-1975, Meded. Landbouwfak.
- MASTERSON J.G. & ROCHE, W.J., 1970 :
 Another paraquat fatality.
 Brit. med. J., 1, 749-750
- MATSUMURA, F. , 1973 :
 Degradation of pesticide residues in the environment. in: Environmental Pollution by Pesticides (ed. C.A. EDWARDS) Plenum Press, London, New York, 542 pp.
- Mc CORD & FRIDOVICH, 1969 :
 Superoxide dismutase : an enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein).
 J. biol. Chem., 244, 6049-6055
- Mc CORD, J.M., B.B. KEELE Jr & I. FRIDOVICH, 1971 :
 An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase.
 Proc. nat. Acad. Sci. USA, 68 (5), 1024-1027
- Mc KEE, J.E. & H.W. WOLFE, 1963 :
 Water quality criteria.
 Calif. State Water Quality Control Bd, Sacramento Pub. No 3A, 548 pp.
- Mc KIM, J.M., J.W. ARTHUR & T.W. THORSLUND, 1975 :
 Toxicity of a linear alkylate sulfonate detergent to larvae of four species of freshwater fish.
 Bull. environm. Cont. Toxicol., 14 (1), 1-7
- Mc LENNAN, M.W., 1974 :
 2,4-D toxicity in dairy cattle.
 Australian veterinary J., 50, 578
- MEEHAM, W.R., NORRIS, L.A. & H.S. SEARS, 1974 :
 Toxicity of various formulations of 2,4-D to salmonids in southern Alaska.
 J. Fish. Res. Bd Canada, 31 (4), 480-485
- MEES, G.C., 1960 :
 Experiments on the herbicidal action of 1,1'-ethylene-2,2'-dipyridylum dibromide.
 Ann. appl. Biol., 48, 601
- MERTENS, J., 1973 :
 Year-round controlled mass reproduction of the zebrafish Brachydanio rerio (HAMILTON- BUCHANAN).
 Aquaculture, 2, 245-249
- MICHAELIS, L., 1932 :
 Ein Reduktions-indikator im Potential-bereich der Wasserstoffüber-spannung.
 Biochem. Zeitschrift, 250, 564

- MICHAELIS, L., & E.S. HILL, 1933a :
Potentiometric studies on semiquinones.
J. Am. Chem. Soc., 55, 1481
- MICHAELIS, L., & E.S. HILL, 1933b :
The viologen indicators.
J. gen. Physiol., 16, 859
- MISRA, H.P. & I. FRIDOVICH, 1971 :
The generation of superoxide radical during the autoxidation of ferredoxins.
J. biol. Chem., 246 (22), 6886-6890
- MONOD, J., 1950 :
La technique deculture continue. Théorie et application.
Ann. Inst. Pasteur, 79, 390-410
- MONOD, J., J.P. CHANGEUX & F. JACOB, 1963 :
Allosteric proteins and cellular control systems.
J. molec. Biol., 6, 306-329
- MORGAN, J.R., 1972 :
Effects of arachlor^R (a polychlorinated biphenyl) and DDT on cultures of an alga, protozoan, Daphnia, Ostracod and guppy.
Bull. environm. Cont. Toxicol., 8 (3), 129-137
- MORTON, R.A. & A.L. STUBBS, 1946 :
Analyst, 71, 348
- MUIRHEAD-THOMSON, 1971 :
Pesticides and freshwater fauna.
Academic Press, London, New York, 248 pp,
- MUR, L.R., 1966 :
Scenedesmus in brak water.
Doktoraatsthesis Universiteit van Amsterdam. Uitg. De Nieuwe Schouw, ZEIST, 168 pp.
- MURRAY, R.E. & J.E. GIBSON, 1972 :
A comparative study of paraquat intoxication in rats guinea pigs and monkeys.
Exp. & molecular Pathol., 17, 317-325
- MURRAY, R.E. & J.E. GIBSON, 1974 :
Parquat disposition in rats, guinea pigs and monkeys.
Toxicol. appl. Pharmacol., 27,
- NEBEKER, A.V. & F.A. PUGLISI, 1974 :
Effect of polychlorinated biphenyls (PCB's) on survival and reproduction of Daphnia, Gammarus and Tanytarsus.
Trans. Am. Fish. Soc., 103 (4), 722-728
- NISSL, D. & M.H. ZENK, 1969 :
Evidence against induction of protein synthesis during auxin-induced initial elongation of Avena coleoptiles.
Planta, 89, 323-341

- OKONEK, S. and A. HOFMANN, 1975 :
On the quaestion of extracorporal hemodialysis in diquat intoxication.
Arch. Toxicol., 33, 251-257
- OKUDA, K., E.V. DURAN and B.F. CHOW, 1960 :
Proc. Soc. exp. Biol. Med., 103, 588
- OMURA, K. & T. MATSUMURA, 1969 :
Tetrahedron Lett., 4199
- OREOPOULOS, D.G., M.A.O.SOYANNWO & R. SINNIH, S.S.A. FENTON, M.G. Mc GEOWN & J.H. BRUCE, 1968 :
Acute renal failure in case of paraquat poisoning.
Brit. med. J., 1, 749-750
- PARKER, C., 1966 :
Influence of water hardness on the phytotoxicity of paraquat.
Nature, 212, 1465-1466
- PERSOONE, G. and P. SORGELOOS, 1972 :
An improved separator box for Artemia nauplii and other phototactic invertebrates.
Helgoländer wiss. Meeresunters., 23, 243-247
- PERSOONE, G. and P. SORGELOOS, 1975 :
Technological improvements for cultivation of invertebrates as food for fishes and crustaceans.. I. Devices and methods.
Aquaculture, 6, 275-289
- PERSOONE, G. & G. UYTTERSROT, 1972 :
Invloed van de kwaliteit van zeewater op de groeisnelheid van mariene eencellige wieren.
Math. Model van de Pollutie van de Noordzee. I.C.W.B. - Technical Report - Physiol. Synthese O4
- PERSOONE, G. & G. UYTTERSROT, 1975 :
The influence of inorganic and organic pollutants on the rate of reproduction of a marine hypotrichous ciliate, Euplotes vannus Muller.
Rev. inter. Océanogr. Méd., 37-38, 125-151
- PERSOONE, G., N. DE PAUW en A. CATTOIR-REYNAERTS, 1975 :
Tertiaire reiniging van varkensmest langs biologische weg door massakweek van eencellige wieren.
Interdisciplinair onderzoeksprogramma voor de studie van de verwerking van dierlijke afvalstoffen. Jaarverslag '74-75, 1-60
- PETERS, R.A., W.M. DEST & A.C. TRIOLO, 1975 :
Preliminary report on the effect of mixing liquid fertilizers and residual herbicides with paraquat and glyphosate.
preprint.
- PIERCE, R.H. Jr, C.E. OLNEY and G.T. FELBECK, Jr, 1971 :
Pesticide adsorption in soils and sediments.
Environm. Letters, 1 (2), 157-172
- PILLAY, A.R. & J.T. TCHAN, 1972 :
Study of soil algae;
VII. Adsorption of herbicides in soil and prediction of their rate of application by algal methods.
Plant and Soil, 36, 571-594
- POCHE, R., 1974 :
Die Pathogenese der Parquat-Lunge.
Pneumologie, 150, 181-184

- POST, G. & T.R. SCHROEDER, 1971 :
The toxicity of four insecticides to four salmonid species.
Bull. Environm. Contam. Toxicol., 6, 144-155
- PPRAM, 1 , 1972 :
Residue analytical method n°1. Determination of residues of paraquat in crops.
I.C.I. Jealott's Hill Research Station, Bracknell, Berkshire, England.
- PPRAM, 5 , 1972 :
Residue analytical method n°5. Determination of residues of diquat in crops and animal tissues.
I.C.I. Jealott's Hill Research Station, Bracknell, Berkshire, England.
- PPRAM, 7 , 1972 :
Residue analytical method n°7. Determination of residues of diquat in milk and water.
I.C.I. Jealott's Hill Research Station. Bracknell, Berkshire, England.
- PRATT, D.M., 1943 :
Analysis of population development in Daphnia at different temperatures.
Biol. Bull., 85, 116-140
- PROVASOLI, L., Mc LOUGHIN, J. & M. DROOP, 1957 :
The development of artificial media for marine algae.
Arch. Microbiol., 25, 392-428
- PROVASOLI, L. & K. SHIRAISHI, 1959 :
Axenic cultivation of brine shrimp Artemia salina.
Biol. Bull., 117, 347-355
- QUE HEE, S.S. & R.G. SUTHERLAND, 1974 :
Volatilization of various esters and salts of 2,4-D.
Weed Science, 22 (4), 313-318
- RAWLS, C.K., 1965 :
Field tests of herbicide toxicity to certain estuarine animals.
Chesapeake Science, 6 (3), 150-161
- ROALES, R.R. & A. PERLMUTTER, 1974 :
Toxicity of zinc and cygon, applied singly and jointly to zebra-fish embryos.
Bull. Environm. Contam. Toxicol., 12 (4), 475-480
- ROBERTSON, B. , 1973 :
Paraquat poisoning as an experimental model of the idiopathic respiratory distress syndrome.
Bull. de Physio-Pathologie respiratoire, 9, 1433-1452
- RODGERS, C.A. & D.L. STALLING, 1972 :
Dynamics of an ester of 2,4-D in organs of three fish species.
Weed Science, 20 (1), 101-105
- ROSE, M.S., L. SMITH and I. WYATT, 1974 :
Paraquat: evidence for energy-dependent accumulation into rat lung.
Nature, 252, 314-315

- ROSEN, J.D., 1972 :
Conversion of pesticides under environmental conditions.
in: EQS, volume 1: Global aspects of chemistry, toxicology and
technology as applied to the environment. Georg.Thieme Verlag Stuttgart
- RUTHVEN, J.A. & J. CAIRNS Jr 1973 :
response of freshwater protozoan artificial communities to metals.
J. Protozool., 20 (1), 127-135
- SANDERS, H.O., 1970 :
Toxicities of some herbicides to six species of freshwater crustaceans.
J. Water Poll. Cont., 42 (8), part 1, 1544-1550
- SANDERS, H.O. & O.B. COPE, 1966 :
Toxicities of several pesticides to two species of Cladocerans.
Trans. Am. Fish. Soc., 95, 165-169
- SAGER, R. & S. GRANICK, 1953 :
Nutritional studies with Chlamydomonas reinhardi.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 56, 831-838
- SAGER, R. & S. GRANICK, 1954 :
Nutritional study of sexual reproduction in four species of
Chlamydomonas.
Am. J. Botany, 46 (2), 65-69
- SAXENA, S.K., L. BOERSMA, F.T. LINDSTROM and J.L. YOUNG, 1974 :
The self-diffusion coefficient of ⁴⁵Ca and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid.
Soil Science, 117 (1), 14-20
- SCHLÖTER, M., 1966 :
Untersuchungen über algizide Eigenschaften von Fungiziden und Herbiziden.
Int. Revue ges. Hydrobiol., 51 (3), 521-541
- SCHLÖTER, M., 1969 :
Zur Bestimmung der Fishtoxizität von Wasserinhaltsstoffen und über Schwellenwerte der Giftwirkung von Herbiziden.
Z. Fischerei N.F., 17 (5-7), 457-471
- SCHRECK, C.B. & P. BROUHA, 1975 :
Dissolved oxygen depletion in static bioassay systems.
Bull. Environm. Contam. Toxicol., 14 (2), 149-152
- SCHULTZ, D.P., 1973 :
Dynamics of a salt of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in fish, water and hydrosol.
J. Agr. Food Chem., 21 (2), 7 pp.
- SCHULTZ, D.P. and P.D. HARMAN, 1974 :
Residues of 2,4-D in pond waters, mud and fish.
Pesticides Monitoring J., 8 (3), 173-179
- SCHULTZ, D.P. and E.W. WHITNEY, 1974 :
Monitoring 2,4-D residues at Loxahatchee national Wildlife Refuge.
Pesticides Monitoring J., 7 (3-4), 146-152
- SEAMAN, D.E. and T.M. THOMAS, 1966 :
Absorption of endothal and diquat by submersed aquatic weeds.
Research Prog. Rept. W.Weed Control Conf., 95 pp.

- SHARP, C.W., A. OTTOLENGHI & H.S. POSNER, 1972 :
Correlation of oarquat toxicity with tissue concentrations and weight loss of the rat.
Toxicol.appl. Pharmacol., 22, 241-251
- SKIDMORE, J.F., 1966 :
Resistance to zinc sulphate of zebrafish (Brachydanio rerio) embryos after removal or rupture of the outer egg membrane.
J. Fish. Res. Bd Canada, 23 (7), 1037-1041
- SLADE, P., 1965 :
Photochemical degradation of paraquat.
Nature, Lond., 207, 515-516
- SLADE, P., 1966 :
The fate of paraquat applied to plants.
Weed Research, 6, 158-167
- SNEDECOR, G. & COCHRAN, 1967 :
Statistical methods.
6th edition Iowa University Press , Iowa, 593 pp.
- SOMERS, J., E.T. MORAN, Jr, & B.S. REINHART, 1974 :
Effect of external application of pesticides to the fertile egg on hatching success and early chick performance. 1. Pre-incubation spraying with DDT and commercial mixtures of 2,4-D: picloram and 2,4-D:2,4,5-T.
Bull. Environm. Contam. Toxicol., 11 (1), 33-38
- SORGELOOS, P., 1973a :
The influence of algal food preparation on its nutritional efficiency for Artemia salina L. larvae.
Thalassia Yugoslavica. Proc. of the Conference on marine invertebrate larvae, Rovinj, 20-27 September, 1973 (in druk).
- SORGELOOS, P., 1973b :
High density culturing of the brine shrimp Artemia salina L..
Aquaculture, 1, 385-391
- SORGELOOS, P., 1975 :
De invloed van abiotische en biotische factoren op de levenscyclus van het pekelkreeftje Artemia salina L..
Doktoraatsthesis R.U.G., 235 pp.
- SORGELOOS, P. & C. BENIJTS-CLAUS, 1975:
Toepassing van de wiskundige methode der variantie-analyse en der regressie-analyse (zgn "response-surface analyse") op de resultaten van biologische experimenten uitgevoerd in functie van 2 variabele factoren.
Addendum van de doktoraatsthesis
- SORGELOOS, P. & G. PERSOONE, 1973 :
A culture system for Artemia, Daphnia and other invertebrates with continuous separation of the larvae.
Arch. Hydrobiol., 72 (1), 133-138
- SORGELOOS, P. & G. PERSOONE, 1975 :
Technological improvements for the cultivation of invertebrates as food for fishes and crustaceans. II. Hatching and culturing of the brine shrimp, Artemia salina L..
Aquaculture, (in druk).

- SPRAGUE, J.B., 1969 :
Measurement of pollutant toxicity to fish. I. Bioassay methods for acute toxicity.
Water Research, 3, 793-821
- Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, 1971 :
Ed. M.J. TARAS, A.E. GREENBERG, R.D. HOAK & M.C. RAND.
13th edition, published by American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation, 874 pp.
- STEPHAN, C.E., 1975
Methods for acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians.
EPA-660/3-75-009. National Environmental Research Center. Office of Research and Development. U.S. Environmental Protection Agency, Corvallis, Oregon.
- STOKES, D.M., J.S. TURNER and K. MARKUS, 1970 :
Effects of diquat on Chlorella. II. Chlorophyll bleaching and plastid structure.
Austral. J. Biol. Sci., 23, 265
- STRYCKERS, J., 1970 :
Onkruidbestrijding.
Kursus van Prof. Dr Ir J. STRYCKERS, R.U.G., 6de volledig herziene uitgave, 357 pp.
- STYLES, J.A., 1974 :
Studies on the effects of paraquat and diquat on cells in culture. Viability of macrophages and fibroblasts incubated with paraquat and diquat.
Brit. J. exp., Path., 55, 71-77
- SUFFLING, R., D.W. SMITH and G. SIRONS, 1974 :
Lateral loss of picloram and 2,4-D from a forest podsol during rainstorms.
Weed Research, 14, 301-304
- SURBER, E.W. and Q.E. PICKERING, 1962 :
Acute toxicity of endothal, diquat, hyamine, dalapon and silvex to fish.
Progressive Fish-culturist, 24 (4), 164-171
- SWAN, A.A.B., 1968 :
Ocular damage due to paraquat and diquat.
Brit. med. J., 2, 624
- SWAN, A.A.B., 1969 :
Exposure of spray operators to paraquat.
Brit. J. industr. Med., 26, 322-329
- SWEDMARK, M., A. GRANMO and S. KOLLBERG, 1973 :
Effects of oil dispersants and oil emulsions on marine animals.
Water Research, 7, 1649-1672
- TBM/3, 1968 :
The colorimetric determination of paraquat in biological samples. I.C.I., Tested Biochemical Method. / 3. Industrial Hygiene Research Laboratories.
- THOMAS, V.M., Jr, L.J. BUCKLEY, J.D. SULLIVAN, Jr & MIYOSHI IKAWA, 1973 :
Effect of herbicides on photosynthesis and growth of marine unicellular algae.
Weed Science, 21(5), 449-451

THRASHER, J.D. & J.F. ADAMS, 1972 :

The effects of four mercury compounds on the generation time and cell division in Tetrahymena pyriformis WH 14.
Environmental Research

TINGLE, L.E., PAVLAT, W.A. & CAMERON, I.L., 1973 :

Sublethal cytotoxic effects of mercuric chloride on the ciliate Tetrahymena pyriformis.
J. Protozool., 20, 301-304

TRAINOR, F.R., 1959 :

A comparative study of sexual reproduction in four species of Chlamydomonas.
Am. J. Botany, 46 (2), 65-69

TUCKER, B.V., D.E. PACK and J.N. OSPENSON, 1967 :

Adsorption of bipyridylum herbicides in soil.
J. Agr. Food Chem., 15 (6), 1005-1008

TUROBOYSKI, K., 1973 :

Biology and ecology of the crab Rhithropanopeus harrisii ssp. tridentatus.
Marine Biol., 23, 303-313

UI, J. and KITAMURA, M., 1969 :

Mercury pollution of sea and fresh water biomass.
Rev. int. Océanogr. méd., 4th Colloquium for medical Oceanography, 1969

UKELES, R., 1962 :

Growth of pure cultures of marine phytoplankton in the presence of toxicants.
Appl. Microbiol., 10 (6), 532-537

UKELES, R., 1970 :

Effect of hexose analogs on growth of Chilomonas paramecium.
J. Protozool., 17 (2), 220-223

VALENTINE, J.P. & S.W. BINGHAM, 1974 :

Influence of several algae on 2,4-D residues in water.
Weed Science, 22 (4), 358-363

VANDERWIELEN, C. and P. SORGELOOS, 1976 :

The use and misuse of Artemia salina nauplii for toxicity tests.
J. Water Poll. Cont. Fed., (in druk)

VAN OORSCHOT, J.L.P., 1964 :

Some effects of diquat and simetone on CO₂-uptake and -translocation of Phaseolus vulgaris.
Proc. 7th Br. Weed Control Conf., 321-324

VAN RENSEN, J.J.S., 1975 :

Lipid peroxidation and chlorophyll destruction caused by diquat during photosynthesis in Scenedesmus.
Physiol. Plant., 33, 42-46

VAN ZON, J.C.J., 1973 :

Visies op de bestrijding van waterplanten in eutroof oppervlaktewater in Nederland.
Landbouwk.Tijdschr., 85, 165-171

- VAN ZON, J.C.J., 1974 :
Biologische onkruidbestrijding in opmars.
Waterbelangen, 10, 1-4
- VAN ZON, J.C.J. en P. ZONDERWIJK, 1973 :
De Nederlandse waterplanten lasten en lusten.
Vakbl. Biol., 12, 53, 215-220
- VLASBLOM, A.G., 1963 :
Het schelpdierlarvenonderzoek in het laboratorium te Wemeldingen (1955-1963).
Thesis, niet gepubliceerd, 218 pp.
- VOIGHT, R.A. & D.L. LYNCH, 1974 :
Effects of 2,4-D and DMSO on procaryotic and eucaryotic cells.
Bull. environm. Contam. Toxicol., 12 (4), 400-405
- WALKER, C.R., 1971 :
Chemicals and their effects on our aquatic environment.
24th annual Meeting of the SE Weed Science Society, Memphis, Tennessee, January 1972
- WALSH, G.E., 1972 :
Effects of herbicides on photosynthesis and growth of marine unicellular algae.
Hyacinth Control J., 10, 45-48
- WEBER, J.B., P.W. PERRY and R.P. UPCHURCH, 1965 :
The influence of temperature and time on the adsorption of paraquat, diquat, 2,4-D and prometone by clays, charcoal, and an anionexchange resin.
Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 29, 678
- WEINTRAUB, R.L., J.W. BROWN, M. FIELDS and J. ROHAN, 1952 :
Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. I. $^{14}\text{CO}_2$ -production by bean plants treated with labeled 2,4-dichlorophenoxyacetic acid.
Plant Physiol., 27, 293-301
- WESSELIUS, J.C., 1973 :
Influences of external factors on the energy conversion and productivity of *Scenedesmus* sp. in mass culture.
Meded. Landbouwhogeschool Wageningen, Nederland, 73-6, 1-97
- WEST, R.A., BARBERA, P.W. J.R. KOLAR and C.B. MURRELL, 1962 :
The agar layer method for determining the activity of diverse materials against selected protozoa.
J. Protozool., 9 (1), 65-73
- WEST, S.H., J.B. HANSON and J.L. KEY, 1960 :
Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the nucleic acid and protein content of seedling tissues.
Weeds, 8, 333-340
- WILSON, F., 1964 :
The biological control of weeds.
Ann. Rev. Entomol., 9, 225-244
- WILSON, D.C. & C.E. BOND, 1969 :
The effects of the herbicides diquat and dichlobenil (casoron) on pond invertebrates. I. Acute toxicity.
Trans. Amer. Fish. Soc., 98 (3), 438-443

WINDELS, A., 1975 :

Kweekproeven met Scenedesmus acutus Meyen var. alternans Hortobagyi in turbidostaat. De opname van stikstof en fosfor uit het voedingsmilieu.

Licentiaatsverhandeling R.U.G., 85 pp.

WISELEY, B. & R.A.P. BLICK, 1967 :

Mortality of marine invertebrate larvae in mercury, copper and zinc solutions.

Austr. J. mar. freshwater Res., 18, 63-72

WOJTALIK, T.A., T.F. HALL and L.O. HILL, 1971 :

Monitoring ecological conditions associated with wide-seale applications of DMA 2,4-D to aquatic environments.

Pestic. Monit. J., 4, 184-203

ZIMMERMAN, P.W. and A.E. HITCHCOCK, 1942 :

Contr. Boyce Thomson Inst., 12, 321

ZWEIG, G. & M. AVRON, 1965 :

On the oxidation-reduction potential of the photoproduced reductant of isolated chloroplasts.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 19, 397-400

ZWEIG, G., 1969 :

Mode of action of photosynthesis inhibitor herbicides.

Res. Rev., 25, 69-79